



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR en tiempo real y análisis de alta resolución en especímenes clínicos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Mario MONTEGHIRFO GOMERO

ASESOR

Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Monteghirfo, M. (2016). *Epidemiología molecular de Mycobacterium tuberculosis mediante PCR en tiempo real y análisis de alta resolución en especímenes clínicos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1296



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

13 (e.n.)

Exped. N° 034-UPG-FCB-16

96

(p. 97 en blanco)

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

Siendo las...10:05... horas del día 14 de Julio, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Sustentación de Tesis presidido por:

Dr. Jorge Alarcón Villaverde	e integrado por
Dra. Egma M. Mayta Huatuco	(Miembro)
Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno	(Miembro)
Dr. Juan A. Jiménez Chunga	(Miembro)
Dr. Armando Yarlequé Chocas	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara el Magister Don MARIO MONTEGHIRFO GOMERO.

Después de darse lectura al Expediente N° 034-UPG-FCB-16, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN EN ESPECÍMENES CLÍNICOS DEL HOSPITAL NACIONAL ARZOBISPO LOAYZA"

y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de:


Excelente con la nota de 19

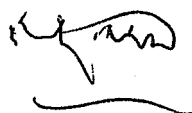
A continuación el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas al Magíster


MARIO MONTECHIRFO GOMEZ


Siendo las *11:40 h* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

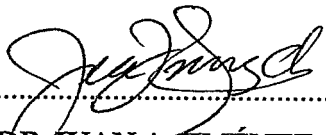
Se extiende la presente Acta en Lima, a los 14 días del mes de julio del año 2016.


.....
DR. JORGE ALARCON VILLAVERDE
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE


.....
DR. ARMANDO YARLEQUÉ CHOCAS
Profesor Principal a T.C.
ASESOR


.....
DRA. EGMA M. MAYTA HUATUCO
Profesora Principal D.E.
MIEMBRO


.....
DRA. SUSANA M. GUTIERREZ MORENO
Profesora Principal a T.C.
MIEMBRO


.....
DR. JUAN A. JIMÉNEZ CHUNGA
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO

Dedicatoria

A mi madre Luzmila Gomero

Por todo el amor recibido de ella

Por ser mi constante compañera.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a todas aquellas personas que durante el desarrollo del presente trabajo me apoyaron y me brindaron su cooperación desinteresada.

A mi asesor Dr. Armando Yarlequé Chocas, mi especial reconocimiento.

Al Dr. Alberto Yuen Morán, por su amistad y por las facilidades brindadas en su laboratorio para la realización del presente trabajo.

A mis colegas, amigos, compañeros del Departamento de Ciencias Dinámicas y del CIBN por su amistad, apoyo y alegría, gracias Mercedes, Doris, Silvia, Myriam, Paolo, Miguel, Rubén, Marco, Clever, Dora y del laboratorio Yuenlab, gracias Maggy, Cesar, Katty, Juan José, Luis, Edwart, Candy y Ana.

Tabla de Contenidos	pag.
I Introducción	1
II Antecedentes	10
2.1 Historia	10
2.2 Agente etiológico	14
2.3 Epidemiología de la tuberculosis	18
2.4 Cepas multidrogorresistentes MDR y cepas Extremadamente resistentes XDR	22
2.5 Tratamiento de la resistencia a drogas en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.6 Diagnóstico de la tuberculosis	24
2.7 Epidemiología molecular	25
2.7.1. RFLP-IS6110 polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de restricción	28
2.7.2. Espoligotipado tipificación con oligonucleótidos Espaciadores	30
2.7.3. MIRU-VNTR micobacterianas interespaciadas de Número variable en tándem	32
2.8. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	35
2.8.1. Cuantificación mediante PCR en tiempo real	39
2.8.2. Análisis de la curva de fusión	40
III. Objetivos de la tesis	42
Objetivo General	42
Objetivos Específicos	42

IV. Material y Métodos	43
4.1 Material Biológico	43
4.2 Materiales	43
4.3 Métodos	44
4.3.1. Extracción del ADN	44
4.3.2. Cuantificación del ADN	45
4.3.3. Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
4.3.4. Análisis de alta resolución del punto de fusión (HRM)	47
4.3.5. Electroforesis en gel de agarosa	49
4.3.6. Interpretación de los resultados	49
4.3.7. Análisis de agrupamiento de los especímenes clínicos	49
4.3.8 Consideraciones éticas	50
 V. Resultados	 50
5.1 Datos epidemiológicos de la población	50
5.2 Análisis por PCR en tiempo real HRM para los 12 loci MIRU	51
5.3 Análisis por electroforesis de los productos de amplificación de los loci MIRU estudiados	55
5.4 Análisis de las frecuencias de los alelos de los 12 loci MIRU	59
5.5 Análisis de la diversidad alélica de los 12 loci MIRU	59
5.6 Análisis de agrupamientos “clusters”	60
5.7 Identificación de las cepas de los especímenes clínicos por Búsqueda de similitud	63
5.8 Identificación del linaje mediante el uso del algoritmo “neighbour- Joining”	67
 VI. Discusión de los resultados	 71
 VII. Conclusiones	 76

VIII. Recomendaciones	77
IX. Referencias bibliográficas	78

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis es, posiblemente, la enfermedad infecciosa más prevalente en el mundo. La genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* se utiliza ampliamente para comprender la transmisión y la prevalencia de diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* proporcionando conocimientos significativos que contribuyen al control y prevención de la tuberculosis.

Se realizó un estudio de epidemiología molecular con 170 especímenes clínicos de aspirado bronquial con sospecha de tuberculosis pulmonar procedente del Laboratorio San Marcos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza de los cuales 35 fueron positivos para *Mycobacterium tuberculosis*. En los especímenes clínicos positivos se analizaron 12 loci MIRU-VNTR. Se utilizó el método de análisis de alta resolución del punto de fusión (HRM) combinado con PCR en Tiempo Real para determinar el tamaño de los productos de amplificación.

Los datos generados usando HRM mostraron que el locus más polimórfico fue el locus 960 con 7 alelos seguido del locus 802 con 6 alelos. El dendrograma dio 4 grupos con gran diversidad debido a la presencia de subgrupos. Se identificaron las 35 cepas presentes en los especímenes clínicos. Los linajes asignados en este estudio fueron Haarlem (62.5%), LAM (28.6%) y Ghana (8.6%).

El método de HRM utilizado en el presente estudio es una aproximación novedosa para los estudios de Epidemiología molecular y genotipificación rápida de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de especímenes clínicos.

Palabras claves: Epidemiología Molecular, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR en Tiempo Real, HRM, identificación de cepas.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex members. Tuberculosis is possibly the most prevalent infectious disease in the world. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* is widely used to understand the transmission and prevalence of different strains of *Mycobacterium tuberculosis* providing significant expertise that contribute to the control and prevention of tuberculosis.

A Molecular Epidemiology study was conducted with 170 clinical specimens of bronchial aspirate with suspected pulmonary tuberculosis from Laboratorio San Marcos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza of which 35 were positive for *Mycobacterium tuberculosis*. In positive clinical specimens 12 loci MIRU-VNTR were analyzed. Analysis method of high-resolution melting point (HRM) combined with Real Time PCR to determine the size of the amplification products was used.

Data generated using HRM showed that the most polymorphic locus was the locus 960 with 7 alleles followed by the locus 802 with 6 alleles. The dendrogram yielded 4 clusters with large diversity due to the presence of subgroups. The 35 strains present in clinical specimens were identified. The lineage assigned in this study was Haarlem (62.5%), LAM (28.6%) and Ghana (8.6%).

HRM method used in this study is a novel approach for Molecular Epidemiology studies and rapid strain genotyping from clinical specimens.

Key words: Molecular Epidemiology, *Mycobacterium tuberculosis*, Real Time PCR, HRM, strain identification.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
°C	Grados centígrados o Grados Celcius
CP	Punto de entrecruzamiento
CT	Ciclo umbral
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DOTS	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
DR	Repeticiones directas
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
DVR	Repeticiones variables directas
EDTA	Ácido etildiamino tetraacético
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
g	Gravedades
HRM	Punto de Fusión de Alta Resolución
IS	Secuencias de inserción
Mb	Megabase
μl	Microlitro
MDR	Multidrogorresistente
MIRU	Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas
LJ	Lowenstein Jensen
mL	Mililitros

MLVA	Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable
OK	Ogawa Kudoh
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD	Derivados proteicos purificados
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
RFLP	Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción
RFU	Unidades de fluorescencia relativa
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
seg.	Segundos
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena simple
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato EDTA
TB-MDR	Tuberculos multidrogorresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente resistente
Tm	Temperatura de fusión
V	Voltios
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNTR	Número variable de repeticiones en Tandem
XDR	Extremadamente drogorresistente

ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1 Clasificación general de los genes de *Mycobacterium tuberculosis*
- TABLA 2 Cebadores o Primers específicos para cada uno de los 12
MIRU-VNTR analizados.
- TABLA 3 Valores de Tm obtenidos para el locus 802
- TABLA 4 Frecuencia alélica en cada locus analizado
- TABLA 5 Diversidad alélica para cada uno de los locus analizados
- TABLA 6 Agrupamientos derivados del dendrograma de similitud de las muestras de
Mycobacterium tuberculosis analizadas
- TABLA 7 Distribución de los linajes identificados por búsqueda de similitud usando el
programa online MIRU–VNTRplus

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Determinantes sociales de la salud como causa de la tuberculosis.
- Figura 2 Tendencias en la tasa de morbilidad y en la incidencia de la tuberculosis
- Figura 3 Mapa circular del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- Figura 4 Distribución mundial de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*
- Figura 5 Ubicación de los 12 loci MIRU más empleados, en la cepa H37Rv
- Figura 6 Distribución de las muestras por género
- Figura 7 Análisis HRM de los productos de amplificación del locus 802 conteniendo diferente número de repeticiones en tándem
- Figura 8 HRM de los productos de amplificación del locus 802 (MIRU 40) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 9 HRM de los productos de amplificación del locus 960 (MIRU 10) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 10 HRM de los productos de amplificación del locus 2531 (MIRU 23) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 11 HRM de los productos de amplificación del locus 4052 (MIRU 26) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 12 HRM de los productos de amplificación del locus 3192 (MIRU 40) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 13 Electroforesis de los productos de amplificación del locus 802 (MIRU 10)) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 14 Electroforesis de los productos de amplificación del locus 4052 (MIRU 26) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas
- Figura 15 Electroforesis de los productos de amplificación del locus 3192 (MIRU 31) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas

Figura 16 Agrupamientos derivados del dendrograma de similitud de las muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas

Figura 17 Identificación por búsqueda de similitud usando el programa online MIRU-VNTRplus.org

Figura 18 Identificación de las cepas de los especímenes usando las cepas de referencia de MIRU-VNTRplus.org

Figura 19 Dendrograma con el algoritmo Neighbour joining (MIRU-VNTRplus)

I. INTRODUCCIÓN

Tomando en cuenta la definición de epidemiología de Alarcón (Alarcón, 2009), la epidemiología molecular podría ser definida como la ciencia que estudia las causas de la aparición, propagación, mantenimiento y descenso de los problemas de salud en poblaciones mediante el uso de las técnicas de la biología molecular -como el estudio del ADN para identificar biomarcadores en muestras humanas-, con la finalidad de prevenirlos o controlarlos. Es decir, la biología molecular al servicio del enfoque epidemiológico. (Wong *et.al.*, 2011).

El término Epidemiología Molecular se aplica a estudios que analizan la diversidad genética de los organismos infecciosos mediante la aplicación de distintas técnicas de laboratorio con objetivos como determinar su naturaleza, establecer su origen más probable, caracterizar una epidemia, conocer las posibles mutaciones relacionadas con patogenicidad, resistencia a los fármacos anti-infecciosos o su persistencia en un ambiente que justifiquen su expansión. En general, se trata de establecer vínculos entre la variabilidad genética del patógeno y su dispersión en la población de hospedadores, que se basan en la identificación exacta de las variantes del agente etiológico. Como muchas otras áreas de la biomedicina, la epidemiología molecular no ha sido ajena a los avances técnicos y metodológicos producidos en las últimas décadas (González-Candelas *et.al.*, 2014).

La epidemiología molecular aplicada al estudio de las enfermedades infecciosas combina los métodos moleculares utilizados para la identificación de agentes patógenos con las herramientas de la epidemiología convencional para el estudio de las enfermedades y sus factores de riesgo (García-García, 2003).

La tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud pública en el mundo y Perú no es la excepción. La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis es, posiblemente, la enfermedad infecciosa más prevalente en el mundo. La

enfermedad ataca preferentemente los pulmones, pero puede también infectar otros órganos como los riñones, el hígado, la piel, meninges dando lugar a las manifestaciones de tuberculosis extrapulmonar.

La tuberculosis se trasmite a través de partículas expelidas por un paciente bacilífero con la tos, estornudo, hablando, etc. Las gotas infecciosas son de un diámetro de entre 0,5 y 5 μm , pudiendo ser producidas alrededor de 400.000 con un sólo estornudo. Un paciente con tuberculosis activa sin tratamiento puede infectar entre 10-15 personas por año las cuales en su mayoría tendrán contactos frecuentes, prolongados, o intensos con el paciente (como por ejemplo, el transporte público a horas punta). El riesgo de contagio aumenta en áreas donde la tuberculosis es frecuente o con pacientes inmunodeprimidos, como los pacientes de VIH con la enfermedad activa (Enarson & Chretien, 1999).

En 2014 se estima que hubo 9,6 millones de nuevos casos de tuberculosis: 5,4 millones entre los hombres, 3,2 millones entre las mujeres y 1,0 millones entre los niños. También hubo 1,5 millones de muertes por tuberculosis (1,1 millones de entre personas VIH-negativos y 0,4 millones entre las personas VIH-positivas), de los cuales aproximadamente 890 000 eran hombres, 480 000 eran mujeres y 140 000 eran niños. WHO, 2015).

El elevado número de casos nuevos se debe a diferentes factores a saber: a la co-infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a la circulación de cepas multidrogorresistentes “MDR” (resistentes a los medicamentos de primera línea Isoniazida y Rifampicina) y extremadamente resistentes “XDR” [cepas MDR, que además son resistentes a medicamentos de segunda línea (cualquier fluoroquinolona y a uno de los tres medicamentos inyectables Amikacina, Kanamicina o Capreomicina)]; a las migraciones poblacionales que permiten la fácil diseminación de la enfermedad de un continente a otro y a otros factores que hacen que la enfermedad haya sido catalogada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como una emergencia mundial desde 1993 (UNAIDS, 2004 , Narvskaya

et.al., 2002, WHO, 2014).

La tuberculosis es una enfermedad social por excelencia, multifactorial y está vinculada estrechamente a la pobreza, hacinamiento, tugurización, desnutrición, al hambre y demás determinantes sociales, culturales, demográficos y ambientales. La tuberculosis es una enfermedad que se presenta principalmente en países en vía de desarrollo por lo tanto el mayor número de casos se da en países del continente Asiático, Africano, y en países de Latinoamérica como Perú, Brasil y Colombia, los cuales reportan el mayor número de casos a nivel Latinoamericano (OPS, 2012).

La mala salud de los pobres, el gradiente social de salud dentro de los países y las grandes desigualdades sanitarias entre los países están provocadas por una distribución desigual, a nivel mundial y nacional, del poder, los ingresos, los bienes y los servicios, y por las consiguientes injusticias que afectan a las condiciones de vida de la población de forma inmediata y visible (acceso a atención sanitaria, escolarización, educación, condiciones de trabajo y tiempo libre, vivienda, comunidades, pueblos o ciudades) y a la posibilidad de tener una vida próspera. Esa distribución desigual de experiencias perjudiciales para la salud no es, en ningún caso, un fenómeno «natural»... Los determinantes estructurales y las condiciones de vida en su conjunto constituyen los determinantes sociales de la salud. (Comisión OMS sobre Determinantes Sociales de la Salud, 2008). OMS, Informe final 2008 de la comisión de determinantes sociales de la salud de la OMS. La figura 1. muestra los determinantes sociales de la salud como causa de la tuberculosis.

La pobreza, la sobrepoblación y la falta de recursos y programas adecuados para el tratamiento de la tuberculosis, han motivado, junto con la aparición del VIH, la aparición y diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR y XDR para las que apenas hay opciones terapéuticas debido a su poder patógeno lo que constituye un determinante microbiológico de patogenicidad muy importante a

tener en cuenta.

Determinantes sociales de la salud como causa de la tuberculosis

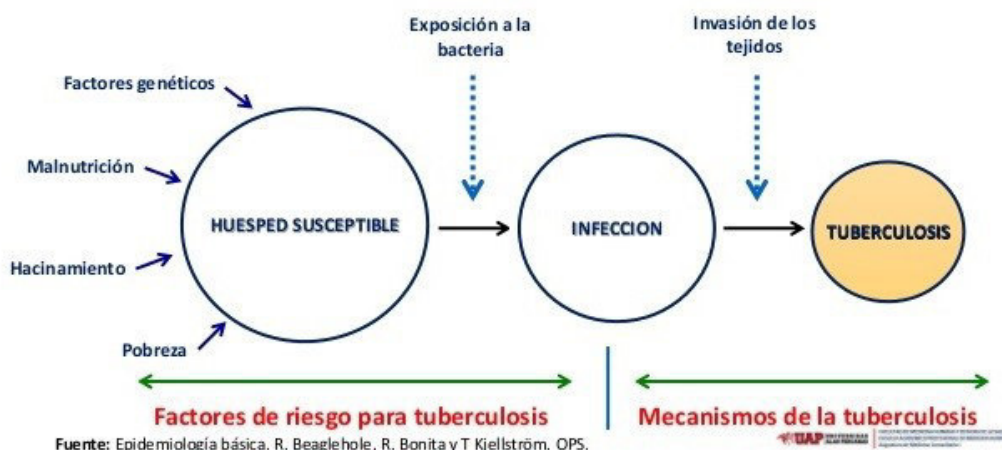


Figura 1. Determinantes sociales de la salud como causa de la tuberculosis.

El Perú concentra el 25% de los casos de la región y comparte con Haití el primer lugar en tuberculosis multidrogorresistente, con altas tasas de incidencia y morbilidad, tal es así que en los últimos años hemos recibido la dolorosa carga de 35,000 casos nuevos por año, concentrándose en Lima y Callao el 58% de los casos MDR y 90% de los casos XDR. Estos índices y porcentajes de este mal en nuestro país son preocupantes a nivel de Latinoamérica y el mundo, razones por las que el Estado ha asumido su responsabilidad en este gravísimo problema de salud pública, acordando entre técnicos, políticos y expertos la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis ESN-PCT es el órgano técnico normativo dependiente de la Dirección General de Salud de las Personas, responsable de establecer la doctrina, normas y procedimientos para el control de la tuberculosis en el Perú; garantizando la detección, diagnóstico, tratamiento gratuito y supervisado a todos los enfermos con tuberculosis, con criterios de eficiencia, eficacia y efectividad. La implementación de las pruebas rápidas MODS (7-14 días) y Genotype (3-5 días), para identificar casos de TB Drogoresistente

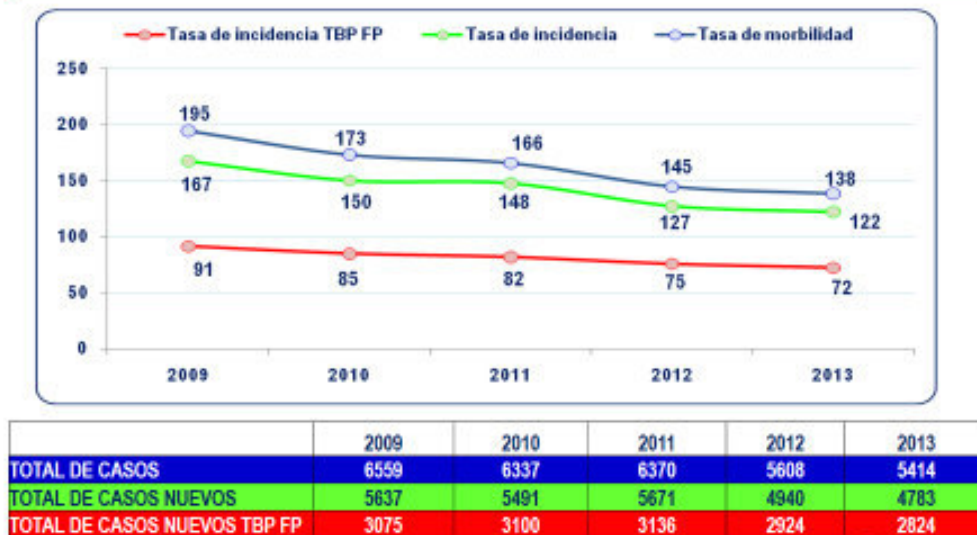
están ayudando a la detección, diagnóstico precoz, así como el tratamiento apropiado, oportuno, gratuito y supervisado de las personas afectadas con TB.

En el Perú la tuberculosis continúa siendo un problema de Salud Pública. En el año 2014 se diagnosticaron 27,350 casos nuevos de tuberculosis (Tuberculosis en todas sus formas), El 82% de los casos de TB notificados en los años 2013 y 2014 y el 17.7 % fueron extrapulmonares. Del total de casos notificados como TB extrapulmonar, el mayor porcentaje (54%) tuvieron localización pleural, seguida de ganglionar (11.1%) y del sistema nervioso (9%), pero también se reportaron casos de localización gastrointestinal, en mamas, urogenital, osteo-articular y de piel pero en menor porcentaje (MINSA, 2016).

En cuanto a TB-MDR 1,273 casos y 61 casos de TB-XDR. Ocupamos en quinto lugar en incidencia de tuberculosis en América luego de Haití, Surinam, Bolivia y Guyana. Lima y Callao tienen las mayores tasas de incidencia con 54% de casos de tuberculosis, 84% de TB-MDR y 90% de TB-XDR. (Chavarri, 2014). Aunque en algún momento se consideró la posibilidad de la erradicación de la TB, con el surgimiento de la pandemia mundial del VIH/SIDA en los 80's y con la aparición cada vez más frecuente de las cepas MDR y XDR, esta meta es cada vez más lejana lo cual se ve reflejado en los datos a nivel mundial, regional y local; sin contar con el subregistro de datos que indica que la situación real mundial puede estar subvalorada (WHO).

La Figura 2. muestra las tendencias en las tasas de en la morbilidad y en la incidencia en el periodo comprendido entre el 2009 al 2013. La tasa de morbilidad del país es de 101.9 (por cada 100 000 habitantes), alta para la región, y además con un control adecuado en los últimos 20 años deberíamos situarnos con una tasa de 28.0. La situación se torna peor cuando consideramos solo Lima – Callao que tienen más de la mitad de los casos de TB. Sus tasas llegan incluso a más del doble del promedio nacional Callao tiene una tasa de 233.1.

Tasa de morbilidad, incidencia y TBP FP, 2009 - 2013



Fuente: Informes Operacionales 2013 ESPCTB-CITE-UE-DISA V.L.C.

Figura 2. Tendencias en la tasa de morbilidad y en la incidencia de la tuberculosis

Son datos preocupantes a pesar de las diferentes estrategias incluyendo la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis ESN-PCT. El Ministerio de Salud, a través de la ESN-PCT busca garantizar que las personas afectadas accedan en forma gratuita en todo el territorio nacional a la detección, diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de dicha enfermedad, asegurando las buenas prácticas de atención con un enfoque de derechos humanos, sin ningún tipo de discriminación, ya sea de género, edad, nivel socioeconómico, raza o etnia y otros (MINSA, 2006).

Uno de los componentes de la Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de la Persona Afectada con Tuberculosis en Perú es la Prevención Secundaria que implica el diagnóstico precoz y el tratamiento. En el diagnóstico es muy importante tener en cuenta que las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con diferentes niveles de resistencia se propagan de la misma manera y con el mismo

riesgo de infección que las cepas plenamente farmacosensibles. Los estudios señalan la prevalencia de los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* Haarlem I y Beijing en pacientes TB-MDR (Flores-Treviño *et.al.*, 2014; Farnia P *et.al.*, 2006).

Se ha reportado que las cepas Beijing tiene una habilidad aumentada para dispersarse y causar la enfermedad, y son consideradas como cepas hipervirulentas y han sido asociadas a multidrogrresistencia. Aunque son altamente prevalentes en Asia, han sido detectadas en todo el mundo. El genotipo Beijing también ha sido reportado en el Perú (Alonso M *et.al.*, 2011).

La epidemiología molecular de la tuberculosis ha aportado información de gran utilidad respecto de la transmisión de la enfermedad, utilizándose como un complemento a la epidemiología clásica. El conocimiento de los distintos genotipos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* ha permitido conocer los tipos más prevalentes en determinadas localizaciones geográficas. Hoy se sabe que ciertos genotipos se diseminan con mayor rapidez (mayor transmisibilidad) o que causan enfermedad de mayor gravedad, asociado a la multi-resistencia; también se ha establecido relaciones entre los genotipos y la respuesta inmunológica del hospedero lo que justifica la necesidad de identificar aquellas cepas prevalentes en cada país o región (Meza P *et.al.*, 2014.; Glynn J R *et.al.*, 2002). Hay estudios que describen métodos para la detección y tipificación simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* en especímenes clínicos (Kamerbeek J., 1997). En consecuencia los estudios de epidemiología molecular aportan información que complementa el nivel de prevención secundaria.

En la epidemiología de la tuberculosis y otras micobacteriosis, como en todas las enfermedades infecciosas, la cuestión clave es definir la fuente de la infección y de revelar sus vías de transmisión y diseminación en el medio ambiente. Para que esto se pueda lograr es de importancia crítica tener la capacidad de poder discernir y hacer seguimientos individuales de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Jagielski *et.al.*, 2014).

La epidemiología molecular es un enfoque poderoso para el control de enfermedades infecciosas (Savine *et.al.*, 2002). Es particularmente importante en el estudio de las enfermedades crónicas, tales como la tuberculosis, donde los pacientes con tuberculosis recurrente pueden estar infectados crónicamente con una cepa dada y la recaída debido a la reactivación de esa cepa o, por el contrario, pueden infectarse con una cepa diferente después de la curación (Van Rie *et.al.*, 1999).

Una distinción correcta entre estas alternativas es esencial para la estimación precisa de las tasas de éxito de los programas de tuberculosis (Bloom & Murray, 1992). Por otra parte, puede dar una visión única de la dinámica de difusión internacional de *Mycobacterium tuberculosis* por la comparación de los aislamientos de áreas geográficas extensas y permite analizar los cambios evolutivos en las poblaciones del patógeno (Supply *et.al.*, 2001).

En las últimas décadas, un gran número de diferentes métodos moleculares basados en huellas de ADN se han desarrollado. La utilidad de estos métodos se ha demostrado principalmente como marcadores epidemiológicos para discriminar el patógeno a nivel de género, especie y subespecie. El nivel de diferenciación de cepas es de importancia crucial para el estudio de la dinámica de la transmisión, para determinar si la infección es causada por una sola cepa o por la cepa múltiple y si la recurrencia de la enfermedad se debe al fracaso del tratamiento o la infección con la nueva cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mathema *et.al.* 2006; Kontsevaya *et.al.*, 2011).

Hoy día existen diferentes herramientas que son usadas por la Epidemiología molecular, disciplina que combina técnicas moleculares con la Epidemiología clásica, con las cuales se han podido identificar los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes a nivel mundial. Las metodologías más empleadas son: RFLP Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción (*Restriction*

Fragment Length Polymorphism) (Van Embden *et.al.*, 1993), Espoligotipificación de Oligonucleótidos espaciadores (Kamerbeek *et.al.*, 1997), MIRUs VNTR Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas-Número variable de repeticiones en Tandem (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat*) (Supply *et.al.*, 1997), entre otras, que han permitido obtener una información valiosa acerca de la dinámica de transmisión de la enfermedad.

Cada una de estas metodologías se ocupa de identificar regiones específicas del cromosoma bacteriano, el RFLP Identifica las secuencias de inserción *IS6110* denominados Hot Spots o Puntos Calientes de *Mycobacterium tuberculosis* (Bloom & Murray, 1992), el espoligotipado por su parte se centra en la amplificación por medio de PCR Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*) de las secuencias interespaciadas del locus DR (*Direct Repeats*) (Supply *et.al.*, 2001) y los MIRUs-VNTR la cual también por medio de amplificación por PCR identifica los loci MIRU semejantes a los minisatélites existentes en eucariotas (Van Embden *et.al.*, Supply *et.al.*, 2001).

Recientemente las mutaciones asociadas a resistencia a fármacos se han utilizado junto con otros marcadores genéticos para definir la agrupación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistente. Las mutaciones asociadas a resistencia de drogas también han sido útiles para evaluar el impacto de las mutaciones específicas en la transmisión y en la generación de casos secundarios de cepas resistentes a los medicamentos (Gagneux S *et.al.*, 2006; Metcalfe J *et.al.*, 2010).

II. ANTECEDENTES

2.1 Historia

La existencia en la tierra del género *Mycobacterium* data desde hace más de 150 millones de años. El género de las micobacterias, al que pertenece el organismo causal de la enfermedad, parece que se asoció por vez primera a los vertebrados antes del paso de estos animales de la vida acuática a la terrestre, hace más de 300 millones de años. Se dice que el ancestro de *Mycobacterium tuberculosis* coevolucionó con los primeros homínidos hace alrededor de 3 millones de años (Ospina, 2001; Small, 1999).

El *Mycobacterium tuberculosis* vendría de una forma bovina de micobacteria y su aparición en el hombre data del Neolítico, estando ligada a la domesticación de los bóvidos, mientras otros autores sitúan su origen en los cerdos, de cuya micobacteria patógena se habrían desarrollado tanto la causante de la tuberculosis como la responsable de la lepra.

Inicialmente la tuberculosis fue denominada como “tisis” en la literatura griega. En los escritos de la Grecia clásica, el concepto de tisis desborda la tuberculosis pulmonar en su sentido actual y a veces se confunde con otras alteraciones respiratorias crónicas, sobre todo con el empiema y la pleuresía. En la medicina helenística y romana la tisis siguió siendo una enfermedad común y en este periodo encontramos ya descripciones muy precisas de la misma en Galeno: fiebre vespertina, sudoración, laxitud, dolor torácico y la hemoptisis como signo patognomónico. Como tratamiento se recomendaba reposo, dieta abundante y largos viajes por mar (Gutierrez *et.al.*, 2005).

La tuberculosis puede causar cambios esqueléticos característicos, tales como colapso de las vértebras (enfermedad de Pott), lesiones reactivas periostio y osteomielitis (Ortner & Putschar, 1981). Tales cambios paleopatológicos han sido reportados en Egipto pre-dinástico (3500-2650 Ac) (Zink *et.al.*, 2001), y en la Suecia

Neolítica (3200-2300 aC) culturalmente asociada con los primeros criadores de ganado. Estos son los casos más antiguos de humanos con tuberculosis confirmada por ADN antiguo. Los casos más antiguos reconocidos solo por los cambios esqueléticos se encontraron en Italia en el Neolítico a partir del cuarto milenio antes de Cristo (Formicola *et.al.*, 1987; Canci *et.al.*, 1996).

Se tiene evidencia de la presencia de tuberculosis en las Américas desde épocas pre-Incas, se ha estudiado momias con lesiones óseas que indican la presencia de mal de Pott (Souza, 2003), y se ha logrado identificar el DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en una momia peruana de 1000 años de antigüedad (Salo *et.al.*, 1994). Por lo que esta infección ha estado distribuida entre las comunidades nativas del Perú y las Américas antes de la colonización española (Culqui *et.al.*, 2010).

En Colombia se identificaron Micobacterias en restos óseos y dentarios de los años 1200 a 1600 DC, en el departamento del Cauca y en una momia prehispánica encontrada en el departamento de Santander en Colombia fué posible diagnosticarle tuberculosis ya que presentaba las lesiones típicas de la enfermedad en los huesos, Mal de Pott y posteriormente fue confirmada por ribotipificación 16S, confirmando la presencia de la enfermedad en la Colombia prehispánica (Small, 1999; Rodríguez *et.al.*, 2000; Martin *et.al.*, 2007).

En Europa la creación de populosas ciudades y la extensa pobreza de la Europa feudal fueron los factores que favorecieron el desarrollo de la epidemia conocida como la “La gran plaga blanca” que inició a principios del siglo XVII y duro aproximadamente 200 años. Cuando los casos de tuberculosis aumentaron y la enfermedad se diseminó a toda Europa occidental, llegó a ser la causa de 25% de las muertes (Bates & Stead, 1993; Palomino *et.al.*, 2007). En América las muertes por la enfermedad alcanzaron una tasa de incidencia de 9.000 muertes por 100 000 habitantes (Torrico, 2004).

Los primeros escritos acerca de tuberculosis proceden de la India cerca de los

años 700 a. C. los cuales describen una enfermedad crónica pulmonar. Años después Hipócrates denominó a este trastorno pulmonar “tisis” que en términos literales significa derretirse o fundirse. Aristóteles observó que la tisis era transmisible de una persona a otra.

En 1546, con la publicación del «*De Contagionis et Contagiosis Morbus*» de Girolamo Fracastorio (1478-1553) aparece la primera enunciación válida de la contagiosidad de la tuberculosis, lo que hará que el gobierno prohíba acoger enfermos tísicos en los hospitales comunales. Considera tres formas de contagio, por contacto directo, por fómites y por el aire, y postula la existencia de «seminaria», partículas muy pequeñas que existirían fuera del cuerpo por muchos años, con poder de infectar (Salo *et.al.*, 1994). Durante los siglos XVI y XVII la tuberculosis causó casi el 20 % de las muertes en Inglaterra, haciéndole decir a John Bunyan en 1.689 que tuberculosis era «el capitán de todos los hombres de la Muerte».

No fue sino hasta alrededor de 1800 cuando se descubrió que la TB era una enfermedad transmisible y se crearon las primeras campañas contra esta; la cual simplemente era poner en cuarentena al paciente para no propagar la enfermedad. En 1839, Johann Lukas Schönlein, Profesor de Medicina en Zurich, reconoció la idea fundamental del tubérculo en la enfermedad y sugirió por primera vez el nombre de tuberculosis, y en 1861, Oliver Wendell Holmes empleó el de «peste blanca», para llamar la atención sobre la acción devastadora de la tuberculosis en la sociedad (Leibbrand & Leibbrand, 1973).

En 1882 el alemán Robert Koch descubre y describe el género *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch y da a conocer una serie de postulados para nombrar una enfermedad infecciosa (postulados de Koch). El descubrimiento del bacilo de la tuberculosis fue anunciado por Koch a la Sociedad de Fisiología de Berlín el 24 de marzo de 1882, razón por la cual se celebra en esa fecha, 24 de marzo de cada año, el Día Mundial de la Tuberculosis (Villalba Coloca). Ese día Koch concluía su presentación: «De aquí en adelante no tendremos más frente a nosotros a una cosa

vaga e indeterminada, estamos en presencia de un parásito visible y tangible. Se desarrolla en el hombre y con cegar las fuentes de donde viene la infección, y una de ellas es seguramente la expectoración, la lucha antituberculosa será un hecho». Gracias a los postulados y a la descripción del bacilo de la tuberculosis Robert Koch se hizo merecedor del premio Nobel de Medicina en 1905 (Ortner & Putshar, 1981; Bates & Stead, 1993; Palomino *et.al.*, 2007).

A partir de ese momento empieza la búsqueda de la curación contra la tuberculosis. Los primeros intentos para curar esta enfermedad son a través de la colapso terapia descrito por Forlanini en 1882. Entre los años 1920 y 1930 los laboratorios de investigación y las empresas farmacéuticas del mundo empezaron a desarrollar una farmacoterapia eficaz contra la tuberculosis.

La quimioterapia se inició después de la purificación de la estreptomicina a partir del cultivo de *Streptomyces griseus* en 1943. La estreptomicina combinaba la máxima inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* con una relativa baja toxicidad. El 20 de noviembre de 1944, el antibiótico se administró por primera vez a un paciente gravemente enfermo de tuberculosis. El efecto fue impresionante. Su enfermedad avanzada se detuvo, las bacterias desaparecieron del esputo, y el paciente tuvo una rápida recuperación. Sin embargo, el nuevo fármaco tiene efectos secundarios especialmente en el oído interno (Hinshaw & Feldman, 1945). Una rápida sucesión de medicamentos contra la tuberculosis aparecieron en los siguientes años. Estos fueron importantes porque debido a monoterapia con estreptomicina, comenzaron a aparecer en unos meses mutantes resistentes, poniendo en peligro el éxito de la terapia con antibióticos. Sin embargo, pronto se demostró que este problema podía superarse con la combinación de dos o tres fármacos.

A raíz de la estreptomicina, se introdujeron como agentes antituberculosos el ácido p-aminosalicílico (1949), isoniazida (1952), pirazinamida (1954), cicloserina (1955), etambutol (1962), y la rifampicina (1963). Los aminoglucósidos como capreomicina, viomicina, kanamicina y amikacina, y las nuevas quinolonas (por

ejemplo, la moxifloxacin, levofloxacin, ofloxacin y ciprofloxacina) son eficaces, pero por lo general se utilizan en situaciones de resistencia a fármacos (Lain, 1963).

En 1921 se realizó la primera aplicación de la vacuna BCG gracias a la atenuación de la virulencia de *Mycobacterium bovis* realizada por Calmette y Guérin, la cual hace parte de los esquemas actuales de inmunización en niños, para evitar la presentación de formas graves de la enfermedad como la tuberculosis meníngea. El desarrollo de estos fármacos disminuyó la prevalencia de la enfermedad y se pensaba que había sido erradicada, sin embargo, en la década de los noventa se demostró que la prevalencia global de tuberculosis sigue aumentando, y se ha demostrado que el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-SIDA) es un factor estrechamente relacionado con el desarrollo de la tuberculosis (Torrico, 2004).

2.2 Agente etiológico

Mycobacterium tuberculosis fue identificado como el agente causal de la tuberculosis en 1882 por Robert Koch, quien logró aislarlo y cultivarlo a partir de pacientes con tuberculosis (Fenton & Vermeulen, 1996). Es un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, de carácter intracelular, posee un alto contenido de lípidos y se puede identificar mediante tinción de Ziehl –Neelsen debido a que son ácido alcohol resistentes (Salysers, 2002). Es de crecimiento lento, se multiplica en promedio cada 20 a 22 horas, por lo que se requiere de 4 a 6 semanas para tener poblaciones densas. Crecen en medios especiales, a temperatura de 37°C y en un rango de pH de 7.0 a 7.2. Las micobacterias son hidrofóbicas, tienden a crecer en agregados, en filamentos o ramificaciones (Shinnick *et.al.*, 1995).

Esta bacteria es un actinomiceto que se encuentra cercanamente relacionada con bacterias saprofitas como *Mycobacterium smegmatis* (Russell, DG. 2001). Hace parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* junto con *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti* con los cuales comparte un 99% de similitud a nivel de nucleótidos, poseen

secuencias casi idénticas de ARN ribosomal (ARNr) 16S y difieren extensamente, en términos de su tropismo, fenotipos y patogenicidad (Brosh *et.al.*, 1995).

Su envoltura celular es poco usual. Partiendo del interior hacia el exterior, presenta una membrana citoplásmica cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos; tal estructura, que le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un buen número de antibióticos, a las tinciones habituales y le da afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen y Kinyoun (Bishop & Newmann, 1970).

Por otra parte, las cadenas de péptidos son antígenos responsables, de manera importante, de la estimulación de la respuesta inmune celular del hospedero (de hecho, se utilizan para preparar derivados proteicos purificados - PPD - útil como prueba de reactividad cutánea para evaluar la exposición a *M. tuberculosis*). Los ácidos micólicos forman complejos con apariencia acordonada cuando se unen a carbohidratos. Los sulfolípidos presentes inhiben la fusión fago-lisosomal y a menudo se consideran indicadores de cepas virulentas. La envoltura celular también incluye adhesinas y no contiene toxinas conocidas.

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia) consiste en 4.4×10^6 pares de bases (pb) y contiene aproximadamente 4000 genes (Figura 3). Cerca de 200 genes del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* codifican para proteínas enzimáticas del metabolismo de ácidos grasos, aproximadamente el 6% del total del genoma (Tabla 1). 100 de ellos están fuertemente implicados en la β -oxidación de ácidos grasos (Smith, 2003).

Tabla 1. Clasificación general de los genes de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Smith, I 2003

Función	No. Genes	% Total	%de Capacidad Codificante
Metabolismo de lípidos	225	5.7	9.3
Vías de señales	207	5.2	6.1
Procesos celulares y pared celular	517	13.0	15.5
Estabilidad de ARNs	50	1.3	0.2
Elementos IS y bacteriófagos	137	3.4	2.5
Proteínas PE* y PPE **	167	4.2	7.1
Metabolismo intermediario y Resp.	877	22.0	24.6
Proteínas reguladoras	188	4.7	4.0
Virulencia, detoxificación	91	2.3	2.4
Funciones hipotéticamente conservadas	911	22.9	18.4
Proteínas de función desconocida	607	15.3	9.9

*, **Proteínas ácidas ricas en glicina

Tiene un alto contenido de guanina-citosina (G-C), el cual es constante a lo largo de todo su genoma [Smith, I. 2003].

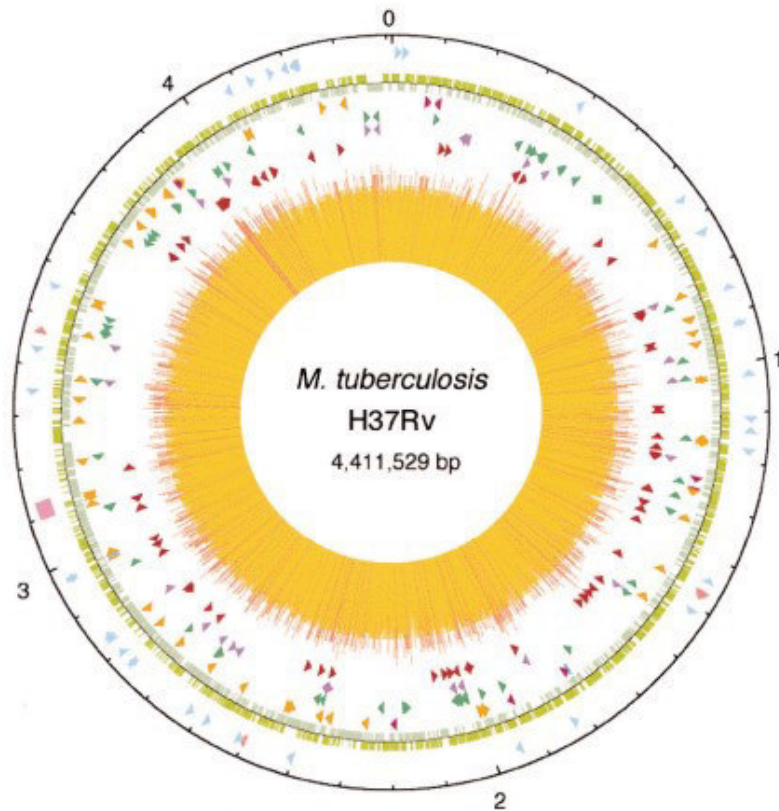


Figura 3. Mapa circular del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. El círculo exterior muestra la escala en megabases (Mb), donde el cero (0) representa el origen de replicación. El primer anillo del exterior denota la posición del gen ARN (ARNt se encuentra en azul, los demás en rosa) y la región repetida directa (cubo rosa); el segundo anillo del interior muestra la secuencia de la cadena codificante de ADN (a la derecha, verde oscuro; a la izquierda, verde claro); el tercer anillo representa el ADN repetitivo (secuencias de inserción, naranja; familia 13E12 REP, rosa oscuro; profago, azul); el cuarto anillo muestra la posición de los miembros de la familia PPE (verde); el quinto anillo muestra los miembros de la familia PE (morado, excepto PGRS), y el sexto anillo muestra la posición de las secuencias PGRS (rojo oscuro). El histograma del centro representa el contenido de G + C en rojo. La figura fue generada con el software DNASTAR (Cole et.al., 1998).

2.3 Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis sigue siendo un importante problema de salud a escala mundial. La cifra estimada de nuevos casos en 2012 fue de 9,0 millones, y 1,5 millones murieron por esta causa (entre ellos 360 000 seropositivos para el VIH). El número de muertes por tuberculosis es inaceptablemente elevado, dado que la mayoría de ellas son evitables.

Se estima que 1,1 de los 9,0 millones (13%) de personas que contrajeron la TB en 2013 eran VIH-positivos. Alrededor del 75% de estos casos correspondían a la Región de África. A nivel mundial, se estima que en 2013 contrajeron TB-MDR 480,000 personas, y que 180 000 fallecieron por esta causa. La mayoría de los casos de tuberculosis y de las muertes por esta causa corresponden a hombres, pero la tuberculosis sigue siendo una de las tres principales causas mundiales de muerte entre las mujeres. En 2012, el número estimado de mujeres fallecidas por tuberculosis fue de 510 000, un tercio de las cuales eran VIH-positivas. En el 2013 el número estimado de casos de tuberculosis en mujeres fue 3.3 millones, 510 000 murieron por esta causa. En 2013 el número estimado de casos de tuberculosis en niños (menores de 15 años) fue de 550 000; 80 000 fallecieron por esta causa (entre los niños VIH-negativos). Estas cifras representan, respectivamente, el 6% y el 8% de las cifras totales mundiales. En 2013 la mayoría de los casos mundiales correspondieron a las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (56%), África (27%) que tiene la tasa más alta de incidencia. Por sí solas, la India y China representaron el 24% y el 11% del total de los casos, respectivamente (WHO, 2014).

En 1993 la tuberculosis fue declarada por la OMS como emergencia mundial, debido al aumento sostenido del número de casos en los últimos años, y a algunos macroindicadores que le confieren a la enfermedad esta característica de emergencia mundial: la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo, de los cuales uno de cada 10 personas desarrollará la enfermedad; más de la mitad de las personas morirán a causa de la enfermedad, si no reciben

tratamiento oportuno; por cada persona bacilífera se infectan aproximadamente de diez a quince personas en el lapso de un año; cada día 20 000 personas desarrollan tuberculosis y de ellas 5000 mueren por su causa; entre las enfermedades de etiología infecciosa, la tuberculosis es la segunda causa de muerte a nivel mundial; se estima que entre el 2000 y el 2020 se infectarán cerca de un billón de personas de las cuales morirán aproximadamente 200 millones de personas si no se aplican medidas eficaces para el control de la enfermedad (WHO, 2014).

La situación actual de la tuberculosis se ve agravada con la aparición en Sudáfrica en el 2006 el primer brote de tuberculosis extremadamente resistente o de resistencia extendida que causa una alta tasa de mortalidad, especialmente en individuos coinfectados por el VIH (Extensively, 2006., Emergence, 2006)

Los datos de vigilancia de la resistencia de drogas indican que en el 2013 aproximadamente 480 000 personas desarrollaron TB-MDR en todo el mundo. Si todos los pacientes de tuberculosis notificados (6,1 millones, nuevos y previamente tratados) hubiesen sido analizados para la resistencia a las drogas en el 2013, se estima que se habrían detectado 300 000 casos de TB-MDR. Se estima que el 9% de los pacientes con TB-MDR tuvieron TB-XDR (WHO, 2014).

En la Región de las Américas se estima que en el año 2011 se produjeron unos 268 400 casos de tuberculosis 100 menos que en el 2010. Alrededor de dos tercios (67%) de todos los casos nuevos de tuberculosis ocurrieron en América del Sur (subregión andina: 29%; otros países: 38%); 17% en México y Centroamérica; 11% en el Caribe, y 5,1% en América del Norte. Brasil ocupa actualmente el 17º lugar en todo el mundo y el primer lugar en las Américas en lo que respecta al número total de nuevos casos de tuberculosis (83 000). El 60% de todos los casos nuevos de tuberculosis que se registraron en la Región de las Américas correspondieron a Brasil, Perú, México y Haití. Más de un tercio de los 77 900 casos nuevos de tuberculosis registrados en los países andinos de América del Sur ocurrieron en Perú (30 000; 39%), que ocupó el segundo lugar en las Américas, seguido por

Colombia (16 000; 21%). La mayor incidencia estimada de tuberculosis por 100 000 habitantes correspondió en el 2011 a Bolivia con 129 casos y Perú con 101 casos, donde había disminuido sustancialmente en los 20 últimos años (OPS, 2012).

En el Perú en el año 2014 se presentaron 27,350 casos nuevos de tuberculosis de todas las formas. Desde el año 1997 hasta el año 2014 se han detectado en nuestro país, más de 15 mil casos de TB MDR. El mayor número de casos de TB MDR se han reportado en los últimos 10 años (del 2005 en adelante) donde, el promedio reportado por año superó los 1100 casos de TB MDR, con una tendencia creciente en los últimos 4 años. El mayor porcentaje de los casos de TB MDR, han sido reportados en departamentos de la costa, Lima con el 83,1% y un 12 % en otros departamentos de la costa. Desde la detección del primer caso con TB XDR (1999) hasta el año 2014, se han diagnosticado más de 600 casos de TB XDR. En los últimos 7 años (2008-2014) se han detectado el 80% de los casos de TB XDR. La proporción de los casos de TB XDR entre los casos de MDR, se ha incrementado de manera acelerada. De menos de 2 casos de TB XDR por cada 100 casos de TB MDR antes del 2005, a 6 para el año 2014 (MINSA, 2016).

Antes del 2005 la TB XDR era un problema centrado en algunos distritos de la provincia de Lima Metropolitana y el Callao, para el año 2009 se reportaron casos en otros 9 departamentos, para el año 2014 se diagnosticaron al menos un caso de TB XDR en más de la mitad de los departamentos del país. El mayor número de casos de TB XDR del país se han detectado en los distritos de Lima metropolitana y el Callao, principalmente en San Juan de Lurigancho, El Agustino, Ate, Santa Anita, La Victoria, San Martín de Porras y Lima Cercado. Para el año 2014 en el país se desarrollaron 27929 pruebas rápidas fenotípicas y moleculares, de las cuales 43% (11954) fueron con Genotype MTBDRplus, con esta prueba se alcanzó una cobertura de 70% en los casos nuevos de TB Pulmonar con cultivo o frotis positivo (MINSA, 2016).

Para controlar la transmisión de la tuberculosis la OMS creó un programa llamado “*Stop TB*” que busca para el año 2015 la reducción a la mitad en la prevalencia y mortalidad de esta enfermedad con respecto al año 1990 y eliminar la tuberculosis como problema de salud para el año 2050. El programa se basa básicamente en seis principios, los cuales son expandir y mejorar el DOTS; hacer frente a la TB acompañada del VIH y TB-MDR; contribuir al fortalecimiento de los programas de salud; involucrar a todo el personal de salud; dar mayor capacidad de acción a los pacientes y comunidades y favorecer y promover las investigaciones por medio de la detección y tratamiento de nuevos casos; detectar al menos el 70% de nuevos casos bacilíferos y tratar a satisfacción al menos el 85% de los casos detectados. Dentro del Programa *STOP TB* se plantea en el mundo la implementación de la estrategia DOTS/TAES, la cual busca que la mayoría de pacientes que adquieren la infección y enferman sean detectados y reciban el tratamiento correcto (OPS, 2006).

La tasa de nuevos casos de tuberculosis en la Región fue de 28 por 100 000 habitantes (rango 26-29). El valor más alto correspondió al Caribe (75 casos) y el más bajo a América del Norte (3,9 casos). A nivel de los países, Haití es el que presenta la mayor tasa de incidencia (222 casos), seguido por Bolivia (131 casos), Guyana (111 casos) y Perú (101 casos). La incidencia ha disminuido constantemente en las Américas desde 1990, y durante varios años en todas las subregiones (y la mayoría de los países), salvo en México y la subregión de Centroamérica, donde alcanzó una meseta en los últimos años, principalmente debido al número constante o ligeramente creciente de casos nuevos de tuberculosis en México. En el 2011, se estima que se produjeron unos 337.000 casos prevalentes de tuberculosis en las Américas, y unas 20.700 muertes debidas a la tuberculosis entre los casos sin VIH. Se estima que en el 2011 hubo unos 6.000 casos de TB-MDR entre los casos de tuberculosis pulmonar notificados en las Américas.

La proporción estimada de TB-MDR fue de 2,1% (1,4%-3,0%), entre los casos

nuevos, y de 11% (8,0%-15%) entre los casos de retratamiento. Siete países (Perú, Brasil, México, Ecuador, Argentina, República Dominicana y Haití) representaron más de 80% de todos los casos de TB-MDR calculados en la Región. La tasa de detección de casos (cualquier forma de tuberculosis) ha aumentado de forma sostenida en las Américas durante los últimos años: de 70% en el 2001 a 84% en el 2011 (OPS, 2012).

2.4 Cepas Multidrogorresistentes MDR y cepas extremadamente resistentes XDR

La TB-MDR se define como la tuberculosis resistente a la isoniazida y la rifampicina, con o sin resistencia a otros fármacos de primera línea. La TB-XDR se define como la tuberculosis resistente al menos a la isoniazida y la rifampicina, y a algún tipo de fluoroquinolona, así como a alguno de los tres fármacos inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina y kanamicina). Uno de los principales impedimentos para el adecuado control de la tuberculosis es la circulación de cepas MDR, lo cual puede ser contrarrestado adecuadamente aplicando métodos de detección rápida de cepas con estos genotipos e implementar estrategias de control adecuadas (Smith, 2003).

En el Perú cada hora cuatro a seis personas se enferman de tuberculosis, esto hace que al año se vean afectados entre 35 000 a 50 000 personas (WHO, 2014); de todos ellos, el 10% contrae la tuberculosis multidrogo-resistente (UNAIDS, 2004) (TB-MDR) que es producida por cepas resistentes a las drogas más efectivas para curar la tuberculosis, como son la isoniacida y la rifampicina. En el 2013 se ha notificado 61 casos de tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), enfermedad producida por cepas mutantes que se han hecho resistentes a las drogas más efectivas para curar a la TB-MDR como son: las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) y una de las tres drogas inyectables de segunda línea (kanamicina, capreomicina o amikacina), lo que hace a estas cepas virtualmente incurables, transmisibles y altamente mortales

(WHO/HT/TB, 2014). Con respecto a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes es importante señalar que se ha sugerido que son menos virulentas que las cepas sensibles (Lambregts, 1998; Zhang, *et.al.*, 1992). Esta sugerencia se apoya en la base molecular de la resistencia a múltiples fármacos, que es la adquisición gradual de nuevas mutaciones (Heym, 1994; Mitchison, 1998). Se cree que el gran número de mutaciones necesarias para producir una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistente tiene un costo de adaptación lo que resulta en cepas menos viables y menos virulentas (Cohn *et.al.*, 1954; Cohn *et al.*, 1954). Estas cepas tienen una menor capacidad para superar las defensas del organismo y, por lo tanto, tienen menos capacidad para producir la enfermedad.

Sin embargo las cepas menos virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes todavía pueden causar la enfermedad en huéspedes inmunocomprometidos, como en las personas coinfectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Debido a la inmunosupresión provocada por el VIH, se sabe que las personas co-infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* tienen un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis activa por la rápida progresión de la enfermedad activa después de la infección primaria y por la reactivación endógena de la infección latente (De Cock *et.al.*, 1999). Los brotes nosocomiales de TB MDR asociados con la infección por el VIH son ejemplos de la peligrosa interacción de estas dos enfermedades (Ritacco *et.al.*, 1997; Edlin *et.al.*, 1992) y la importancia de la transmisión nosocomial de la TB-MDR entre los pacientes VIH positivos.

2.5 Tratamiento de la resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis se puede tratar con una terapia de seis meses de antibióticos. En los 2 primeros meses se suministran cuatro medicamentos rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida etambutol, en los 4 siguientes meses son tratados con RIF e INH.

Si las cepas son resistentes a INH y RIF, es decir TB-MDR se requiere un tratamiento por 2 años con drogas de segunda línea como aminoglucósidos, etionamidas, quinolonas, D-cicloserina y péptidos básicos. (Ricardi *et. al.*, 2009). Debido a que el período de Tratamiento de la tuberculosis es demasiado largo, las interrupciones en el consumo de las drogas pueden conducir a la resistencia a los medicamentos. Se ha identificado a nivel mundial la tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR). Este tipo de tuberculosis es causada por una micobacteria que es resistente por lo menos a 2 drogas de segunda línea, por ejemplo, aminoglucósido y fluoroquinolona y a alguno de los tres fármacos inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina y kanamicina). (Jain & Mondal, 2008; Zignol *et.al.*, 2006). Por lo tanto la notificación precisa de los casos, el análisis de las cepas MDR, XDR y el estudio de los mecanismos de la resistencia a las drogas ayudará a identificar y eliminar los factores de riesgo para la propagación de estas cepas en la sociedad.

2.6 Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico de la tuberculosis se lleva a cabo a partir de la identificación de la bacteria en muestras provenientes del tracto respiratorio en caso de tuberculosis pulmonar o de secreciones, líquidos o biopsias de otras partes del cuerpo en el caso de tuberculosis extrapulmonar. (OPS, 2006).

El método de elección para el diagnóstico de tuberculosis es la baciloscopia de esputo la cual busca la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) y, el cultivo de los especímenes clínicos en medio de Ogawa Kudoh (OK) o Lowenstein Jensen (LJ). La baciloscopia es un método ventajoso para el diagnóstico de tuberculosis ya que es una técnica relativamente sencilla, de muy bajo costo, pero presenta problemas a nivel de sensibilidad ya que en pacientes que no expulsan gran cantidad de bacilos no es posible detectarlos, en estos casos se realiza el cultivo el cual sirve para diagnosticar los pacientes con baja carga bacilar, pero presenta el inconveniente que demora mucho el crecimiento y por lo tanto el

diagnóstico, pero es muy útil para los pacientes que presentan resistencia a medicamentos, para la posterior realización de pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosos (Ricardi et.al., 2009; Jain & Mondal, 2008; Ziano et.al., 2006).

Otras metodologías que apoyan el diagnóstico de la TB son los rayos X, métodos inmunológicos tales como el Elisa, la realización de la prueba de la tuberculina (Salyers, 2002; Shinnick et.al., 1995; Alcaide, 2009) que actualmente ha caído en desuso, métodos automatizados para la detección rápida de crecimiento bacteriano como BACTEC MGIT (Asensios et.al., 2012).

Las limitaciones que presentan los métodos tradicionales utilizados en el proceso de diagnóstico de infecciones por micobacterias han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para el aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Hace 2 décadas, la irrupción y el posterior desarrollo de las técnicas de biología molecular en el mundo de la microbiología clínica han supuesto un gran avance en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

En la actualidad hay múltiples técnicas moleculares (comerciales y caseras) para el diagnóstico molecular de la tuberculosis. También hay métodos moleculares basados en PCR como INNO-LiPA® Rif. TB, Genotype® MTBDRplus (Asensios et.al., 2012) y Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Molina-Moya et. al., 2015) que se fundamentan en la detección de las mutaciones más frecuentes relacionadas con la resistencia fenotípica a múltiples fármacos. Estos métodos pueden detectar la multirresistencia a partir del cultivo y de la muestra clínica en una jornada laboral con excelente sensibilidad y especificidad (Alcaide, 2009).

2.7 Epidemiología Molecular

Desde finales del siglo pasado, la caracterización genotípica de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, ha revolucionado el conocimiento de la

transmisión de la tuberculosis brindándole una nueva dimensión a la epidemiología convencional y ha tenido un gran impacto en el control de la enfermedad a nivel mundial. Las técnicas de genotipificación existentes han permitido definir o refutar posibles errores de laboratorio y casos de reactivación latente o reinfección endógena, detectar y estudiar brotes nosocomiales identificando las cadenas de transmisión y los casos de infección secundaria (Mathema et.al., 2015). También se han aplicado a estudios genético-poblacionales en donde se ha determinado el porcentaje de transmisión reciente y los factores de riesgo asociados a ella encontrándose que ha sido mayor que el estimado anteriormente con herramientas epidemiológicas convencionales. Adicionalmente, las técnicas genotípicas han permitido conocer la estructura poblacional clonal de *M. tuberculosis* caracterizada por diferencias en la distribución geográfica, inmunogenicidad y la asociación con cepas MDR (Behr & Mostowy, 2007).

Una distinción correcta entre estas alternativas es esencial para la estimación precisa de las tasas de éxito de los programas de tuberculosis. Por definición la tasa de éxito de los programas de tratamiento de tuberculosis está dado por el porcentaje de casos nuevos registrados con baciloscopía positiva (infecciosos) que fueron curados o en que se completó un curso completo del tratamiento. (loom & Murray, 1992). Por otra parte, puede dar una visión única de la dinámica de difusión internacional de *Mycobacterium tuberculosis* por comparación de los aislamientos de áreas geográficas extensas y permite analizar los cambios evolutivos de las poblaciones del patógeno (Supply et.al., 2001). Existen muchos estudios moleculares de *M. tuberculosis* en los países industrializados pero hay pocos estudios en los países en desarrollo. Un estudio realizado en Rio de Janeiro, Brasil muestra que las cepas predominantes son Latin America y Mediterranean (LAM), Haarlem (H) y el linaje T (Vasconcellos, 2014). Otro estudio realizado en Chile muestra que las cepas LAM y T fueron las más frecuentes (39,5 y 32,5%, respectivamente), seguidas por Haarlem (7,0%), Beijing (4,7%) y X (2,3%) (Meza, 2014). Otro estudio realizado en Chile muestra que las cepas LAM y T fueron las más frecuentes (39,5 y 32,5%, respectivamente), seguidas por Haarlem (7,0%),

Beijing (4,7%) y X (2,3%). La figura 4. Muestra la distribución mundial de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Meza, 2014).



Figura 4. Distribución mundial de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Modificado de Demay, 2012)

Los resultados obtenidos mediante estudios de epidemiología molecular en los países desarrollados muestran un alto polimorfismo en los patrones genéticos de las cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Heldal *et.al.*, 2000). Esto se explica por dos factores: El porcentaje relativamente alto de casos en áreas de baja incidencia debido a la reactivación endógena y la gran proporción de casos en estas áreas provenientes de poblaciones con diferentes orígenes geográficos, las cuales introducen cepas exóticas desconocidas en estas áreas (Van Soolingen, 2001).

Debido a la secuenciación total del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* se han identificado diversos marcadores genéticos utilizados para la caracterización y diferenciación de cepas que infectan personas en un periodo determinado, los cuales facilitan la caracterización de las cepas sin tener que realizar la secuenciación completa de las bacterias lo cual constituye un ahorro en costos y tiempo. El desarrollo de metodologías de “fingerprinting” ha permitido realizar estudios de transmisión global de la enfermedad, que permiten una comparación de cepas circulantes en distintas poblaciones y de esta manera establecer si hay un flujo genético de una población a otra, caracterizar brotes, hacer distinción entre transmisiones recientes o antiguas, detectar si hay contaminación cruzada en el laboratorio, detección de reinfección o recaída en pacientes con episodios secundarios de tuberculosis, identificación de poblaciones con alto riesgo de transmisión para la posterior implementación de la estrategia de control adecuada para contrarrestar la transmisión (Kwara *et. al.*, 2003; Hawkey *et.al.*, 2003).

Un método de genotipificación molecular debe ser preferiblemente rápido y sencillo de realizar, no debe ser costoso, fácilmente aplicable sobre material clínico o que no requiera una gran cantidad de bacterias en cultivo, que tenga un buen poder para discriminar o diferenciar cepas, que los marcadores genéticos sean estables, etc. (Sun *et.al.*, 2004). Existen un conjunto de métodos moleculares disponibles para la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* los cuales son usados en forma rutinaria o en ocasiones especiales (Behr & Mostowy, 2007).

2.7.1 RFLP-IS6110 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

El RFLP-IS6110 se basa en el análisis de la “huella dactilar” del ADN de diferentes aislamientos clínicos en cuanto al número de copias y posición en el genoma del elemento repetitivo IS6110. (Kremer *et.al.*, 2005; Rasolofo-Razanamparany *et.al.*, 2001).

Esta técnica fue estandarizada por Van Embden en 1993 y era considerada como Gold Estándar para la tipificación de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. La secuencia de inserción 6110 se presenta en el genoma de la micobacteria y su localización y número de copias es variable, oscila entre 0 a 25, confieren un alto polimorfismo y son estables, lo cual le proporciona a esta metodología un amplio poder discriminatorio (Van Embden *et.al.*, 1993; Bauer *et.al.*, 1999).

El primer paso para realizar un RFLP es la purificación de ADN a partir de un aislado de *M. tuberculosis*. Se añade una enzima de restricción que corta el ADN en cientos de fragmentos diferentes en secuencias específicas. Los fragmentos se separan por tamaño en un gel de agarosa y se transfirieren a una membrana. Se utiliza una sonda para detectar los fragmentos que contienen IS6110 y la imagen se captura en la película. Cada copia de IS6110 produce una banda. Los Patrones de RFLP basado en IS6110 que contienen 7 ó más bandas proporcionan una mayor especificidad en la discriminación entre los aislamientos que los patrones con 6 o menos bandas.

A pesar de ser el RFLP-IS6110 una técnica con elevado poder de discriminación y de gran aplicabilidad, tiene varias limitaciones, entre las más importantes están, que se necesita 50 microgramos de ADN purificado, es técnicamente demandante y de intensa labor, requiere 2 a 3 días, tiene bajo poder discriminatorio en cepas con menos de seis copias de IS6110 y baja reproducibilidad entre laboratorios (Bauer *et.al.*, 1999).

Por este motivo, se han diseñado más de una decena de herramientas de caracterización genotípica alternativas (basadas fundamentalmente en la reacción en cadena de la polimerasa), sin embargo, la inmensa mayoría no ha pasado los controles internacionales por presentar problemas de reproducibilidad, confiabilidad o baja resolución. Las dos técnicas que más se emplean en la actualidad son: la tipificación con oligonucleótidos espaciadores (*Spoligotyping*,

abreviatura en inglés) (Kamerbeek *et.al.*, 1997) y la tipificación con unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias-repeticiones en tándem de número variable (MIRU-VNTR, siglas en inglés) (Supply *et.al.*, 2006).

2.7.2 Espoligotipado. Tipificación con oligonucleótidos espaciadores

Se han introducido los métodos de tipificación basados en PCR, los cuales presentan muchas ventajas con respecto al RFLP-IS6110. Son métodos fáciles de realizar, requieren 10 ng de ADN para llevar a cabo la amplificación, los resultados son arrojados en 1 día y por lo general la interpretación de los mismos se hace con códigos numéricos lo cual facilita su interpretación y comparabilidad entre laboratorios y crear bases de datos en donde reposan los diferentes genotipos reportados mundialmente (Behr & Mostowy, 2007; Peter *et.al.*, 2003).

El espoligotipado fue estandarizado por Kamerbeek *et al.* 1997 es un método de tipificación secundario para aquellas cepas que presentan pocas copias de IS 6110, es útil para diferenciar las diferentes especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. microtti*, *M. bovis*, *M. africanum*) y además diferencia las diferentes familias o linajes de *Mycobacterium* ya que arrojan espoligotipos propios de cada linaje (LAM, CAS, Haarlem, Beijing, Familia X, Familia T) (Kamerbeek *et.al.*, 1997).

El espoligotipado se ha utilizado para la tipificación secundaria de los aislamientos con cinco o menos bandas de IS6110 (Sioini *et.al.*, 2001; Flores *et.al.*, 2010; Yang *et.al.*, 2001). También se ha utilizado como un método de genotipificación primaria en combinación con MIRU-VNTR. El Spoligotyping se basa en el polimorfismo que se presenta en el locus de la repetición directa (DR). Esta región consiste de copias DR de 36 bases intercaladas con secuencias no repetitivas de 35-41 pares de bases llamadas espaciadores. El DR y los espaciadores juntos se denominan repeticiones variables directas (DVRs). Hay 94 secuencias espaciadoras; sin embargo, se utilizan 43 espaciadores en la metodología de tipificación más común (74). La región DR evoluciona a través de

mutaciones mediadas por *IS6110*, por recombinación homóloga entre secuencias repetidas que conduzcan a la delección de un DVR, deslizamiento de hebras que conduce a la duplicación de un DVR y mutaciones puntuales (Aga *et.al.*, 2006, Leibbrand & Leibbrand, 1973; Lain, 1963)]. Se ha estimado que la tasa de cambio de la región DR es más lenta que la de *IS6110*; sin embargo, no hay estimación exacta (Niemann *et.al.*, 1999; Fenton & Vermeulen, 1996).

El espoligotipado es un método basado en la PCR que amplifica el espaciador; la presencia y ausencia de los espaciadores se traducirá en diferentes polimorfismos. Dos métodos usados actualmente para obtener el espoligotipo. El primero uno (el método original) se basa en la hibridación reversa donde las secuencias de cada uno de los espaciadores son unidas a áreas específicas sobre una membrana y donde los productos de PCR se hibridizan con la membrana (Driscoll, 2009). Los patrones (presencia y ausencia de espaciadores) se representan como un número binario o, después de una conversión simple, como un número octal. El segundo método se basa en la tecnología Luminex (Luminex Tecnología, TX, EE.UU.), donde cada uno de los oligonucleótidos espaciadores se une covalentemente a una microesfera, que sirve como una sonda de captura. Cada microesfera también contiene dos fluorocromos covalentemente unidos. Un láser excitará los fluorocromos para identificar el espaciador. El segundo láser excitará un fluorocromo reportero unido al producto del PCR que contiene el espaciador (Cowan *et.al.*, 2004). Las ventajas del spoligotyping con 43 espaciadores es que es altamente reproducible ya que se basa en la amplificación PCR y necesita 20-50 ng de ADN. Se ha utilizado con ADN extraído directamente de esputo de pacientes con baciloscopia positiva (Cafrune *et.al.*, 2009). El método de presentación de informes simples (binario u octal numeral) lo cual ha permitido la creación de una base de datos mundial de los patrones de “spoligotyping” [43203]. La principal limitación es el poder discriminatorio inferior en comparación con la tipificación *IS6110*-RFLP y MIRU lo que impide que sea utilizado como método de tipificación primario.

2.7.3 MIRU-VNTR Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas-Número Variable de Repeticiones en Tándem

Las Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas-Número Variable de Repeticiones en Tándem es considerada por algunos autores como el nuevo estándar de oro para la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* ya que es altamente discriminativa y reproducible (Weniger *et.al.*, 2010). Este método de genotipificación en los VNTR de los elementos genéticos llamados MIRUs. Las unidades repetitivas tienen entre 40 a 100 pares de bases de longitud y se localizan en 41 loci distribuidos a lo largo del genoma de *M. tuberculosis*.

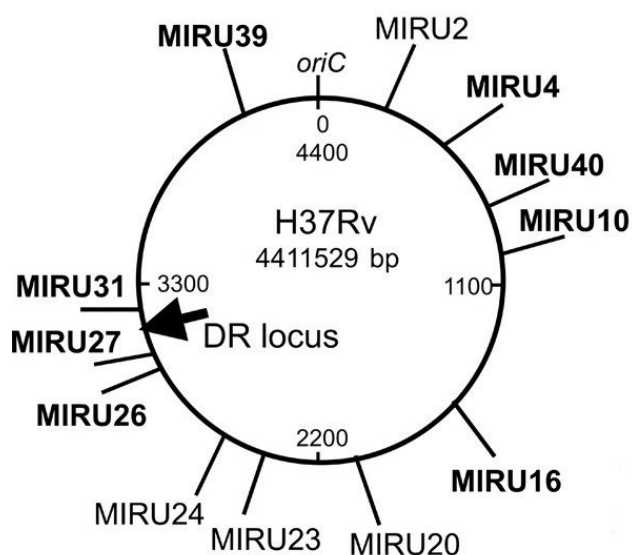


Figura 5. Ubicación de los 12 loci MIRU más empleados, en la cepa H37Rv

Inicialmente se describieron 12 locus altamente polimórficos, pero recientemente se ha descrito que 24 de estas unidades son altamente polimórficas y varían en el número de copias entre aislados de *Mycobacterium tuberculosis* no relacionados confiriéndole un mayor poder discriminatorio a esta metodología y convirtiendo estas regiones como las estructuras más variables del genoma de *M. tuberculosis*. Entre estos loci, existen repeticiones en tándem similares a los minisatélites de

humanos (Takashima & Iwamoto, 2006).

La genotipificación de las Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas-Número Variable de Repeticiones en Tandem se basa en la amplificación por PCR usando cebadores específicos para las regiones flanqueantes de los diferentes MIRUs. El protocolo original incluye la amplificación de cada locus y la visualización del producto en un gel. Debido a (Mazars *et.al.*, 2001).

La genotipificación MIRU-VNTR es más rápida y menos laboriosa que el RFLP-IS6110, se aplica a bajas concentraciones de ADN, se necesita 10 ng de ADN genómico a comparación de 50 ug que se utiliza para RFLP-IS6110, extraídos de cultivos micobacterianos jóvenes y a formatos de alto alcance. Los resultados se expresan como códigos numéricos (basado en el número de secuencias repetitivas llamadas regiones polimórficas micro o minisatélites), y son también fácilmente comparables entre laboratorios. Un número importante de estudios demuestran que la tipificación por MIRU-VNTR es un método reproducible, confiable, que ofrece un nivel de discriminación superior a la tipificación por RFLP-IS6110 ((Takashima & Iwamoto, 2006).

Una base de datos epidemiológica mundial está disponible (Weniger *et.al.*, 2010; MIRU-VNTRplus). El análisis de estos datos ha dado lugar a ideas sobre la distribución y evolución de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo la identificación de las familias de *Mycobacterium tuberculosis* clonalmente relacionadas en distribuciones geográficas específicas (Ferdinand *et.al.*, 2004; Gagneux & Small, 2007).

Hay dos métodos disponibles para determinar el tamaño de los amplicones, a saber, electroforesis en gel de agarosa (Blackwood *et.al.*, 2004; Supply *et.al.*, 2001) y electroforesis capilar (Allix *et.al.*, 2004, Sun *et.al.*, 2004). En el primero, los tamaños de los amplicones con el análisis tipo huella digital “software” de computadora o por comparación visual con un estándar de marcadores tamaño

molecular de ADN después de la electroforesis en gel de agarosa. Es bien sabido que, si bien este método es barato y simple, varios factores pueden influir en los resultados finales, el más importante es la distorsión de las bandas durante la electroforesis lo cual puede conducir a malas estimaciones del tamaño del fragmento (Le Fleche *et.al.*, 2002; Yokooyama *et.al.*, 2006). Además, es difícil obtener los números exactos de las repeticiones en tándem, lo que puede dar lugar a resultados diferentes para la misma cepa. Al contrario la electroforesis capilar tiene una gran capacidad para medir el tamaño de los fragmentos en un solo experimento sin las deficiencias antes mencionadas. Sin embargo, su alto costo y el requerimiento de un equipo especializado han limitado su aplicación.

Además, se informa que el tamaño de los amplicones puede variar según el tipo de marcador de tamaño interno utilizado (Lindstedt *et.al.*, 2004).

Se ha descrito un método de alto rendimiento método basado en PCR multiplex en que cada cebador de un conjunto de cebadores está marcado con un colorante fluorescente diferente. Los amplicones marcados con fluorescencia se someten a electroforesis y se utiliza un secuenciador automático con el fin de estimar el tamaño del amplicón (Supply *et.al.*, 2001). La ventaja de técnica de MIRU_VNTR automatizada de MIRU es que es altamente reproducible y rápida porque los resultados se obtienen a través del análisis computarizado de las señales (en contraste con la visualización de cada producto en agarosa gel, que es menos reproducible y consume más tiempo). Sin embargo, requiere un secuenciador y paquetes de “software” especializados. (Supply *et.al.*, 2006).

Recientemente se ha descrito un nuevo método de genotipificación por PCR llamado Análisis de Alta Resolución del punto de fusión de los MIRU-VNTR con el cual se detecta el tamaño de amplicones. Este método se realiza conjuntamente con un PCR cuantitativo (qPCR). El método es preciso y es fácil de realizar y sus resultados pueden ser convertidos a códigos numéricos que se generan teniendo en cuenta el número de repeticiones en tándem en los loci MIRU (Pang *et.al.*, 2011).

2.8 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

La PCR cuantitativa se desarrolló por primera vez en 1993 mediante la construcción de un sistema que detecta los productos de PCR a medida que se acumulan (Higuchi *et.al.*, 1993) Inicialmente, este sistema de "tiempo real" incluyó el colorante intercalante bromuro de etidio que se incorpora en el ADN durante la amplificación, un termociclador modificado con una fuente de luz ultravioleta (UV) para iluminar las muestras y la detección de la producción de fluorescencia con una cámara CCD. La amplificación produce cantidades crecientes de ADN de doble cadena que se unen al bromuro de etidio, por lo tanto, aumenta la intensidad de la señal fluorescente a medida que se producen más copias de ADN. El sistema después representa las unidades de fluorescencia relativa (RFU) en el eje y frente al número de ciclo en el eje x.

La PCR cuantitativa se puede dividir en tres fases distintas: la amplificación exponencial (geométrica), la amplificación lineal y la región de la meseta. Durante la fase exponencial del proceso de PCR, la reacción resulta en una duplicación teórica de amplicones con cada ciclo. Si bien no se logra la eficiencia ideal, la duplicación es cercana al 100%, dando una relación consistente entre el ADN de entrada y la cantidad de producto. Al comienzo de la fase exponencial, la línea de base establece el umbral y se produce cuando la señal de fluorescencia es consistente con los niveles normales de fondo. Durante el proceso de amplificación de una muestra, el punto en que el nivel de fluorescencia supera el umbral se denomina el ciclo umbral (CT). El valor CT está inversamente relacionado con la concentración del ADN molde en el comienzo del proceso de qPCR, por lo tanto, es menor para una muestra con una concentración inicial más alta y es más alto para una muestra de concentración inferior (Wilhem *et.al.*, 2000). Los valores de CT de las muestras se comparan con la curva estándar para determinar la concentración inicial.

Los valores de CT son determinados por una relación lineal entre el logaritmo de la concentración del molde de ADN y el número de ciclos de PCR (Butler, 2005).

Durante la fase lineal, el consumo de algunos de los reactivos del PCR, tales como dNTPs, cebadores y Taq polimerasa, impedirá la eficiencia porque se consumen a diferentes velocidades. Por esta razón, esta fase no es útil para la comparación de datos. A medida aumenta la cantidad de productos, hay un agotamiento de los reactivos críticos, dando como resultado la disminución gradual en la velocidad de formación del nuevo producto. Finalmente, la PCR entra en la fase meseta y la concentración del producto permanece constante.

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de realizar ninguna acción adicional, como elaboración, tinción y visualización de geles. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite evaluar y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. La PCR puede dividirse en 4 fases: la de crecimiento linear, la exponencial temprana, la exponencial y la de finalización (plateau). La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial temprana, y el ciclo de PCR en el que se produce es denominado Ct (Curve threshold o CP (Crossing point)). Este valor está relacionado con el número de copias blanco que posee la muestra que se está evaluando, lo cual permite que a través de la PCR en tiempo real se realice cuantificación con una alta sensibilidad y especificidad (Walker, 2002). Esta PCR y la PCR de transcriptasa reversa en tiempo real han permitido realizar con mucha eficiencia la medida de la expresión génica, con lo que se han logrado avances muy importantes en el conocimiento de aspectos relevantes sobre cáncer, enfermedades infecciosas y expresión de marcadores, entre otros.

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real, los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia que simultáneamente a la reacción indican en la pantalla la fluorescencia emitida por cada muestra evaluada, lo que permite saber el momento

real en que empieza la amplificación.

La fluorescencia emitida se debe a la acción de agentes intercalantes o marcadores de unión de ADN y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los primeros son compuestos que se insertan entre las bases de una molécula del ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias (por ejemplo, colorantes de acridina, bromuro de etidio y SYBR green). La emisión de fluorescencia se da cuando se unen a ADN de cadena doble, de tal forma que cuanta mayor cantidad de producto genere la reacción de PCR, mayor cantidad de fluorescencia será emitida (Higuchi et.al., 1993; Nicklas & Buel, 2003).

Los agentes intercalantes han sido ampliamente usados, pero tienen la desventaja de que al unirse a todo tipo de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros (si los hay) o productos inespecíficos (si los hay), pueden generar resultados falsos positivos al momento de realizar la identificación de un gen o segmento específico de ADN. De la misma forma, con este tipo de fluorocromos no se puede usar PCR múltiplex, ya que no diferencian un amplicon de otro. Esto implica que cuando se usa SYBR green, se deben tener condiciones de PCR óptimas y diseños de primer exactos que eviten la formación de dímeros. Es recomendable iniciar la síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR), lo cual disminuye la formación de inespecificidades. Para ello se usan las Taq polimerasas modificadas, que se activan a altas temperaturas, o anticuerpos que evitan la acción de la polimerasa a temperaturas inferiores de 97 °C. Los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia de amplificación, es decir, son ensayos de detección independientes de la secuencia. Los ensayos en los que se analizan secuencias específicas mediante PCR en tiempo real usan sondas marcadas con fluorocromos, y estas pueden ser simples, de hibridación o de hidrólisis.

Sondas simples: corresponden al tipo más sencillo de sonda diseñada para la detección de mutaciones y polimorfismos de nucleótido único (SNP). Se usan sondas marcadas con un fluorocromo en el extremo 3' o 5', que se hibridan

específicamente a la secuencia que contiene el SNP de interés . La fluorescencia es mayor en aquellas muestras en que la sonda es de hibridación, lo que permite identificar normales, homocigotos o heterocigotos para un SNP particular.

El análisis del SNP se realiza monitoreando el comportamiento de las curvas de fusión de la sonda. Midiendo la fluorescencia se puede detectar la fusión de los híbridos sonda-blanco gracias a un incremento en la temperatura. Así, cuando el apareamiento es perfecto, las temperaturas son mayores, y ante la presencia de un SNP, disminuyen (Lay & Wittwer, 1997; Crockett & Wittwer, 2001).

Sondas de hibridación: varias sondas de secuencia específica usan el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), que está basado en la transferencia de energía de una molécula fluorescente a otra molécula fluorescente adyacente, las cuales constituyen el donador y el aceptor (Cardullo *et.al.*, 1998).

Estas sondas pueden ser utilizadas según los métodos de tres o cuatro oligonucleótidos. El método de 4 oligonucleótidos consiste de dos pares de primers y dos sondas secuencia específicas que están unidas de manera adyacente una a la otra en una conformación de cabeza-cola. La sonda upstream está marcada con un fluorocromo aceptor en el extremo 3' y la sonda downstream posee un fluorocromo donador en el extremo 5'; así, estos extremos sufren un incremento en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) cuando se unen. Cuando se usan estas sondas para análisis de dosis génica, la cuantificación se realiza evaluando la cantidad de fluorescencia emitida, la cual es directamente proporcional a la cantidad de blanco de ADN generado durante la PCR. En el análisis de SNP se analizan curvas de melting. ya que un mal apareamiento simple entre la sonda de hibridación y el blanco, dado por la presencia de un polimorfismo, disminuye la temperatura melting, la cual es fácilmente detectada en las curvas correspondientes. Se observan dos sondas marcadas con dos fluorocromos diferentes, la emisión de fluorescencia se logra cuando el donador y el aceptor se

encuentran muy cerca (Wittwer *et.al.*, 1997).

Sondas de hidrólisis: las sondas de hidrólisis emiten fluorescencia cuando la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa las separa del blanco. Esos ensayos han sido convencionalmente llamados "TaqMan", o ensayos de nucleasas 5'. Esta sonda simple contiene un reportero y un extintor fluorescente, que están cercanos uno a otro, momento en que no se emite fluorescencia. Durante la PCR, la actividad nucleasa 5' de la polimerasa elimina la sonda, separando el reportero del extintor, momento en el que se da emisión de fluorescencia. Los productos de PCR que se acumulan son detectados directamente midiendo la intensidad de la fluorescencia, dado que esta solo se produce si la sonda se hibrida, una ausencia de señal indicaría que la región complementaria a la sonda diseñada no está en el blanco de amplificación (Gibson *et.al.*, 1996; Holland *et.al.*, 1991).

2.8.1 Cuantificación mediante PCR en tiempo real

Una de las aplicaciones más importantes de la PCR en tiempo real es la cuantificación de dosis génica que permite la evaluación de deleciones y duplicaciones sobre genes específicos y la cuantificación de expresión génica. La cuantificación por PCR en tiempo real se ha realizado de manera absoluta o relativa.

Cuantificación absoluta: usa estándares de concentración conocida que han sido diluidos, de tal manera que se generen curvas estándares. Estas curvas producen relaciones lineales entre el C_t o C_p y la cantidad de RNA o cDNA, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas mediante el análisis de sus C_t o C_p y aplicando la ecuación de la recta. El uso de este método asume que la eficiencia de amplificación es la misma para todas las muestras

Cuantificación relativa: Durante la cuantificación relativa, los cambios en la expresión del gen o genes de interés que están siendo evaluados son medidos

tomando como la base la expresión de un control externo o una muestra de referencia, llamada calibrador (Walker, 2002).

2.8.2 Análisis de la curva de fusión

La estructura de doble hélice de Watson y Crick de una molécula de ADN consta de dos hebras antiparalelas que están unidas entre sí a través de un proceso conocido como hibridación, donde los nucleótidos se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias (Butler, 2005). En la regla apareamiento de Chargaff, establece que la adenina (A) se aparea con la timina (T) y la guanina (G) se aparea con la citosina (C), que por lo tanto, significa que el porcentaje de bases en el ADN debe ser igual para A y T, así como G y C (Chargaff, 1951). Dos puentes de hidrógeno se forman entre los pares de bases AT y tres enlaces de hidrógeno entre pares de bases GC. Por lo tanto se requiere más energía para romper los enlaces de GC ya que tienen una estabilidad térmica superior a los enlaces AT (Butler, 2005). Una molécula de ADN puede ser rico en contenido de AT en una región y rica en contenido de GC en otras regiones. Por tanto, la molécula se funde en segmentos ya que los pares AT se separan antes de que los pares GC a medida que se incrementa gradualmente la temperatura.

Los enlaces de hidrógeno que unen las cadenas de ADN pueden romperse (denaturación) en diversas condiciones. La denaturación se produce a temperaturas elevadas o por el proceso de tratamiento químico con ácidos, álcalis o por agentes oxidantes, reductores, quelantes o agentes denaturantes. La molécula de ADN también puede ser denaturada colocándola en una solución de sal de baja fuerza iónica (Butler 2005).

El proceso de desnaturalización es reversible. Una vez que un fragmento de ADN está expuesto a altas temperaturas se separará en sus dos hebras. Sin embargo, cuando se reduce la temperatura el ADN de cadena simple se adherirá a

su secuencia complementaria y reasocian entre sí. El proceso en el que las cadenas complementarias se vuelven a formar a su conformación original se conoce un renaturación o reasociación.

El análisis de alta resolución de la curva de fusión (HRMA) se usa generalmente en combinación con qPCR. Se genera después de la amplificación por PCR e indica un cambio en la fluorescencia conforme la temperatura se eleva por una fracción de grado, desde 60°C y aumenta lentamente hasta 90°C. Los amplicones extinguidos producen un cambio significativo en la señal fluorescente, ya que se denaturalizan. La diferencia en la fluorescencia se utiliza para determinar la temperatura de fusión (T_m), la temperatura en la cual se produce la disociación del amplicón.

El software para la curva de fusión representa gráficamente la velocidad de cambio de las unidades de fluorescencia relativa (RFU) con el tiempo (T) ($D(RFU) / dT$) en el eje Y frente a la temperatura en el eje X. El resultado es una curva de fusión de ADN con un pico que ocurre en el T_m . Los sistemas que se utilizan la química TaqMan no pueden realizar análisis de la curva de fusión ya que la formación del ADN de doble cadena se controla en estos sistemas mediante el uso de sondas externas. El T_m de una muestra depende de la longitud del producto, la secuencia, contenido de GC y de la complementaridad de las hebras (Ririe *et. al.*, 1997). La forma precisa de la curva también está en función de la secuencia de ADN que se está denaturando. Esto permite que los amplicones que tienen diferentes longitudes y secuencias puedan ser discriminados sobre la base de la forma de la curva de fusión, independientemente de que comparten la misma T_m .

El análisis de la curva de fusión también se usa para los estudios de genotipificación (Lay & Wittwer, 1997) y cambios epigenéticos en el ADN. Una técnica que en la actualidad está siendo rápidamente adoptada es el análisis de fusión de alta resolución (HRM). Es un método relativamente nuevo de análisis post-PCR se utiliza para identificar las variaciones en las secuencias de ácidos

nucleicos. Al igual que el análisis de la curva de fusión, el HRM se utiliza para caracterizar las muestras de acuerdo a su comportamiento de disociación en la transición de dsDNA a ssDNA conforme aumenta la temperatura acoplado a la detección por fluorescencia. Las muestras también se pueden discriminar en función de su secuencia, longitud, contenido de GC o complementariedad de las hebras. Sin embargo, HRM va más allá del análisis tradicional curva de fusión, ya que permite el estudio de la denaturación térmica de dsDNA con mucho más detalle, lo que permite la detección de cambios sutiles en la secuencia, contenido de GC o estructura.

Con este fin se emplean colorantes intercaladores fluorescentes, como el SYBR Green, Eva Green para el análisis de la curva de fusión post- PCR en tiempo real.

III. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron:

OBJETIVO GENERAL

Describir la epidemiología molecular de las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR en tiempo real y análisis de alta resolución en especímenes clínicos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipificar mediante MIRU-VNTR las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de especímenes clínicos obtenidos en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza.
2. Estandarizar la técnica de tipificación molecular mediante análisis de HRM de las secuencias MIRU-VNTR para la identificación de las cepas circulantes en especímenes clínicos.
3. Identificar las cepas presentes en la población estudiada.
4. Determinar el porcentaje de cepas agrupadas

5. Determinar los loci MIRU más polimórficos en los especímenes clínicos estudiados

V. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se analizaron 170 especímenes clínicos de aspirado bronquial con sospecha de tuberculosis pulmonar procedente del Laboratorio San Marcos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza de los cuales 35 fueron positivos para *Mycobacterium tuberculosis*. En los especímenes clínicos positivos se analizaron 12 loci MIRU-VNTR. Se utilizó el método de análisis de alta resolución del punto de fusión (HRM) combinado con PCR en Tiempo Real para determinar el tamaño de los productos de amplificación.

Variables de Estudio

Se tuvieron en cuenta las variables epidemiológicas de los 170 pacientes tales como género y baciloscopía. Una vez recopilados los datos de las variables clínicas antes mencionadas y la de los patrones de cada aislamiento se realizó un análisis de los agrupamientos formado por las cepas para determinar su posible asociación con las diferentes variables con el fin de observar el comportamiento de estas dos características en la muestra estudiada.

El portal de Internet VNTR Plus: <http://www.miru-vntrplus.org/> se utilizó para la construcción de los dendrogramas para obtener la cantidad de patrones únicos y agrupados usando los genotipos obtenidos por MIRUs-VNTR.

4.2 Materiales

Los reactivos para PCR en tiempo real fueron grado biología molecular. Los

“kits” utilizados fueron de las casas Roche, Los cebadores o primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Extracción del ADN

La extracción de ADN de especímenes clínicos de aspirado bronquial se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el Manual del kit extracción High Pure PCR Template (Barletta et.al., 2013). Preparación con el Kit de Roche. Brevemente:

A un tubo de microcentrífuga Eppendorf libre de nucleasa de 1.5 ml:

- Se añadió 200 µl de líquido broncoalveolar
- Se añadió 200 µl de Buffer de Unión (Binding Buffer)
- Se añadió 40 µl de Proteinasa K (reconstituida)
- Se mezcló inmediatamente e incubó a + 70 ° C por 10 minutos
- Se adicionó 100 µl de isopropanol y se mezcló
- Se insertó un High Pure Filter Tube(Tubo con filtro) en un tubo de Colecta (Collection Tube)
- Se pipeteó la muestra en el reservorio superior para el buffer del tubo con Filtro FilterTube)
- Se colocó todo el High Pure Filter Tube en una centrífuga estándar de mesa.
- Se centrifugó por 1 min a 8,000 x g
- Después de la centrifugación:
- Se retiró el Tubo con Filtro (Filter Tube) y se desechó el tubo de colecta (Collection Tube)
- Se adicionó 500 µl del Buffer removedor del Inhibidores al Tubo con Filtro.
- Se centrifugó por 1 min a 8,000 x g.
- Se separó el Tubo con Filtro del Tubo de Colecta
- Se adicionó 500 µl del Buffer de lavado (Wash Buffer) al reservorio superior del Tubo con Filtro)

- Se centrifugó por 1 min a 8,000 x g se descartó el filtrado.
- Se separó el Tubo con Filtro del tubo de colecta.
- Se colocó el Tubo con Filtro en un nuevo Tubo de Colecta
- Se centrifugó por 1 min a 8,000 x g y se descartó el filtrado.
- Después de descartar el filtrado se centrifugó una vez más por 10 segundos a máxima velocidad.
- Se descartó el Tubo de Colecta
- Para eluir el ADN se insertó el Tubo con Filtro en un tubo de microcentrifuga Eppendorf de 1.5 mL
- Se añadió 200 µl Buffer de Elución en el reservorio superior del Tubo con Filtro
- Se centrifugó todo el conjunto por 1 min a 8,000 x g.
- El tubo de microcentrifuga Eppendorf con el ADN eluido y purificado fue almacenado a + 4 °C para su posterior análisis

4.3.2 Cuantificación del ADN

Se realizó la cuantificación del ADN extraído por colorimetría con el equipo Qubit® 2.0 Fluorometer, mediante el uso de fluoróforos. La solución de trabajo estuvo compuesta de Qubit Reagent: 1 µl y Qubit buffer: 199 µl. Se tomó 198 µl de solución de trabajo y se le agregó 2 µl de ADN, se agitó con un vortex por 3 segundos. Se dejó reposar por dos min y luego se hizo la lectura con el Qubit® 2.0 Fluorometer. Se utilizó una curva estándar para determinar la concentración del ADN.

4.3.3 Detección de *Mycobacterium tuberculosis*

Para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en los especímenes clínicos se utilizó el ensayo LightMix® Kit y el equipo de PCR en tiempo real Roche Diagnostica LightCycler® 2.0. El kit provee un método rápido para identificar

Mycobacterium tuberculosis en extractos de ácidos nucleicos.

El kit se basa en la amplificación de un fragmento de 200 pb de longitud del gen 16S rRNA, que tiene un sitio unión de la sonda específica *para Mycobacterium tuberculosis* que se detecta en el canal 640/530 y un sitio conservado para el género que se detecta en el canal 705/530.

El protocolo consistió de 4 programas

Programa 1: Denaturación del ADN y activación de la enzima

Programa 2: Protocolo de amplificación del ADN blanco

Programa 3: Curva de fusión para la identificación de la especie de *Mycobacterium tuberculosis*

Programa 4: Enfriamiento del instrumento

Programa Paso:		Denaturación	Ciclos			Fusión				Enfria.
Setting LC 480 II	Parámetro									
	Modo de Análisis	Ninguno	Modo de Cuantificación			Modo de Curva de Fusión				Ninguno
	Ciclos	1	45			1				1
	Blanco (°C)	95	95	64	72	95	85	40	85	40
	Hold (hh:mm:ss)	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:40	00:00:20	00:00:01	00:00:30	00:00:01	00:00:30
	Vel. Rampa(°C/s)	20	20	20	20	20	20	0.2	0.2	20
	Blanco Sec. (°C)	0	0	57	0	0	0	0	0	0
	Paso Size (°C)	0	0	7	0	0	0	0	0	0
	Paso de Retardo (Ciclos)	0	0	10	0	0	0	0	0	0
	Modo Adquisición	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Contin	Ninguno

Las muestras se amplificaron como sigue: paso inicial de desnaturalización 95°C durante 10 min para activación de la ADN Taq FastStart polimerasa y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 seg, hibridación a 50°C durante 10 seg, y una extensión a 72°C durante 20 seg.

Después de la fase de amplificación, se realizó un análisis de la curva de fusión de 40°C a 65°C con una velocidad de transición de temperatura de 0.1°C/seg para determinar los valores de la temperatura de fusión (Tm) para la secuencia blanco de las sondas de hibridación. Los valores de Tm ya sea de

forma automática o manualmente fueron generados por el instrumento. Un T_m de 65°C en el canal 640 indicó la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* y un T_m de 64°C en el canal 705 indicó la presencia de cualquier miembro del género *Micobacteria*.

4.3.4 Análisis de Alta Resolución del Punto de Fusión (HRM)

A partir del ADN de cada uno de los especímenes clínicos se realizó la amplificación por PCR en Tiempo Real del set de 12 loci, empleando para ello la lista de los primers específicos (Tabla 2) y el kit Type it HRM PCR kit de Quiagen. En tubos Eppendorf de 200 µl se incorporaron para cada reacción de PCR en Tiempo Real 2x HRM PCR Master Mix que contiene HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, Type-it HRM PCR Buffer, Q-Solution EvaGreen Dye y el ADN purificado proveniente de cada uno de los especímenes clínicos. Se incluyó como un control de la reacción ADN proveniente de la cepa de referencia H37Rv. El volumen final de reacción fue de 20µl.

Tabla 2. Cebadores o Primers específicos para cada uno de los 12 MIRU-VNTR analizados.

MIRU	Secuencia del “primer”, Forward y Reverse	Tamaño del amplicón (pb)
2	F 5'-AGGTGGGGGCACCTCCCACTTGCG R 5'-GGACCATGGCAGCTTGTTGCCAGC	53
4	F 5'-GCTGAGCCGATGACCTGCGCCGACG R 5'-CCTCCACAATCAACACACTGGTCA	77
10	F 5'-ACAGCACCGTCTTATCGGACTGCAC R 5'-GTCGGCCACGACCGATAATGGAGC	53
16	F 5'-CCGCGAAGCCGCGAGTACCACCTCGG R 5'-ACGGCAGCGCCCGACGCCTACGCTG	53
20	F 5'-CGAAGCAAGCGGAGGTGCAAGTGCC R 5'-TGGCGGGTATGTGCGTGCTCATTGG	77
23	F 5'-AATTCTTCGGTGGTCTCGAGTGCTCC R 5'-GGTGTCCAACCTACGGTGTAGCGTCG	53
24	F 5'-CTGGCCAAGACCGAATGCGGGTTGC R 5'-TCCGCAAGCGGGAGGTGCCCCCACC	54
26	F 5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC R 5'-TCGCCGCAACTGCCTCGCGGAATAGG	51
27	F 5'-CGCCGTTTCGCGGGCGCTCCGGTGACC R5'-CTCCCGGTGACACGTGACGGGGCATC	53
31	F 5'-CTCCATTTTCTCTTCGGCGTCGAAG R5'-AACGCTGGTCACCACCTAAGGGGAC	53
39	F 5'-CGGTTCTCGAGGAGGCGCCGACACC R5'-TCCAGCACAACCTCGCGCAGCGTCC	53
40	F 5'-GCAGCAGGCCGATCGACCTGTTCCG R 5'-CTAATCAGGTCTTTCTCTCACGCTC	54

La amplificación se realizó en un equipo de PCR en Tiempo Real LightCycler 480 II (Roche), de acuerdo a las siguientes condiciones: un ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 42 ciclos que consisten en las siguientes temperaturas y tiempos: 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos y 72°C durante 30 segundos,

finalmente un ciclo de 5 minutos a una temperatura de 72°C para una última elongación. Para el análisis de Alta Resolución de la curva de fusión (HRM) de los productos de PCR de cada par de primers, los productos fueron calentados a 95°C por 2 minutos, seguido de 2 minutos a 50°C. La frecuencia para la colecta de la intensidad de la señal fluorescente será de 50 veces por grado. El análisis del T_m se realizó con el software The LightCycler® 480 Software, Versión 1.5 suministrado por el equipo.

4.3.5 Electroforesis en Gel de Agarosa

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2.0%. Se empleó como buffer de corrida TBE 0.5X (Tris-Borato 400 mM, EDTA 20 mM, pH 8.0). Se empleó un marcador de peso molecular de 100pb. Se colocaron 5µl de muestra y 3µl de marcador de peso molecular. La corrida electroforética de los productos se realizó a un voltaje de 80V durante una hora. El gel se tiñó con el colorante Sybr Safe. La visualización de las bandas presentes se realizó mediante el empleo de un transiluminador de luz azul.

4.3.6. Interpretación de los resultados

La determinación del número de repeticiones en tándem para cada locus MIRU se realizó con los valores de T_m de los amplicones obtenidos en el LightCycler 480 II usando un análisis de HRM.

Los valores del número de repeticiones en tándem para cada MIRU-VNTR se consignaron en una base de datos elaborada en hojas de cálculo de Excel 2010®.

4.3.7 Análisis de agrupamiento de los especímenes clínicos

Para la identificación del linaje filogenético, el análisis y visualización de los datos genotípicos y el acceso a la nomenclatura MLVA MtbC15-9 se utilizó el programa online MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org). Para calcular el índice de diversidad el programa MIRU-VNTR plus calcula la distancia genética entre pares de especímenes tomando en cuenta la proporción de loci MIRU-VNTR en los cuales los alelos son diferentes, es decir, la proporción de desjustes “mismatches”.

5.3.8 Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos del presente estudio preservaron la integridad y los derechos fundamentales de los pacientes sujetos a investigación, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética de investigación biomédica. Se garantiza la confidencialidad de los datos obtenidos.

V. RESULTADOS

5.1 Datos epidemiológicos de la población

Se analizaron 170 especímenes clínicos de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar. Los especímenes fueron colectados durante el periodo de Marzo a Junio del 2013. De los 170 especímenes clínicos colectados 35 fueron positivos para *Mycobacterium tuberculosis*. 37.1% ($n= 13$) pacientes positivos fueron hombres, y el 62.9% ($n= 22$) fueron mujeres, la edad promedio de población fue de 41 ± 16 años. (Figura 6). En los 35 especímenes clínicos positivos se analizaron 12 loci MIRU-VNTR.

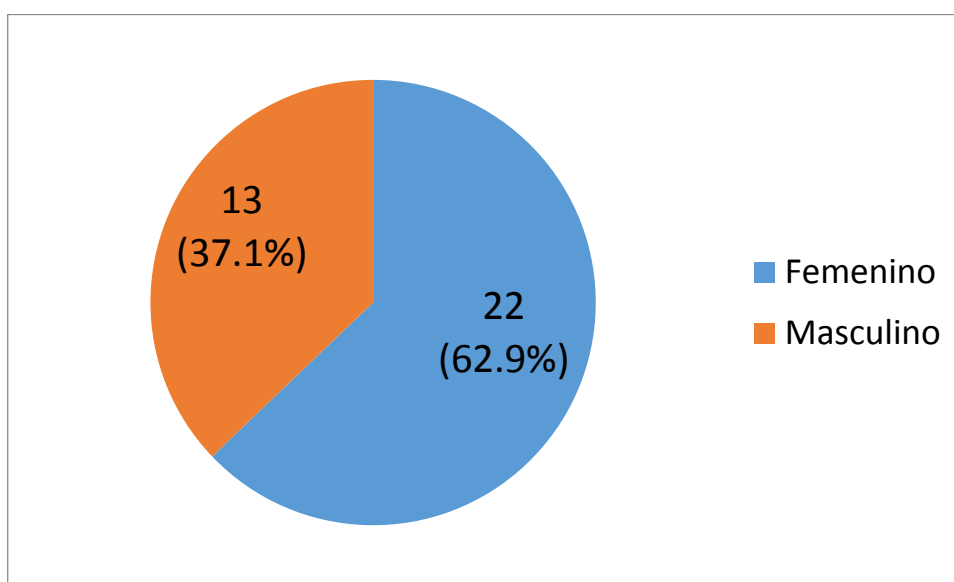


Figura 6. Distribución de las muestras por género

5.2 Análisis por PCR en Tiempo Real HRM para los 12 loci MIRU

Los PCR se realizaron según la metodología propuesta por Pang (Pang et.al., 2011) en el 2011 con las modificaciones mencionadas en la metodología. Se utilizó el mismo tipo de mezcla con las mismas proporciones para cada uno de los loci MIRU, variando únicamente los cebadores que son específicos de cada locus, la temperatura de fusión de los productos de PCR varían según el número de copias de MIRUs presentes en cada espécimen cuyo número se calculó una vez se obtuvieron las temperaturas de fusión (T_m) luego de realizar un análisis HRM de los productos de amplificación. El cálculo se realizó como se explicó en el numeral 4.3.6 de la metodología. La figura 7 muestra los picos correspondientes a los valores de temperatura de los puntos de fusión para el locus 802 (MIRU 40)

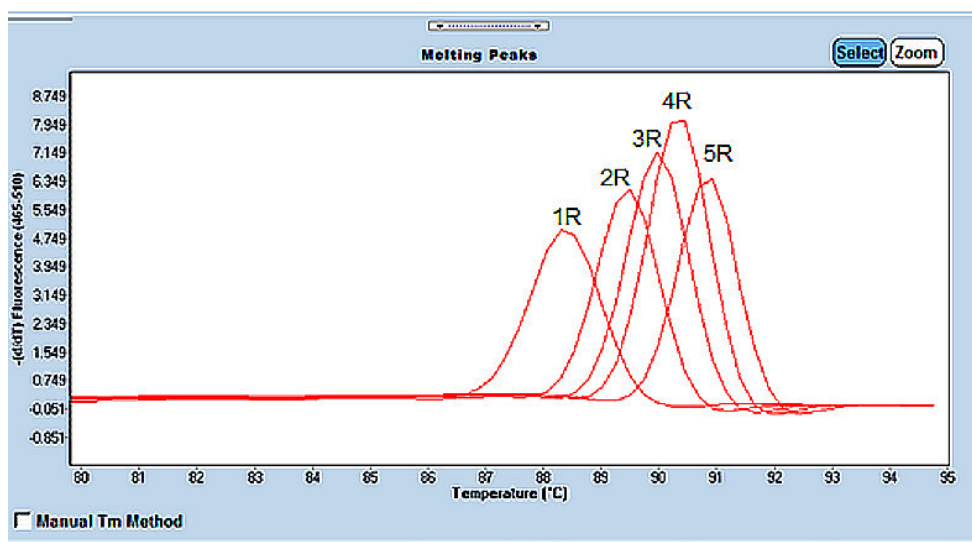


Figura 7. Análisis HRM de los productos de amplificación del locus 802 (MIRU 40) conteniendo diferentes números de repeticiones en tándem R = repetición.

Tabla 3. Valores de Tm obtenidos para el locus 802 (MIRU 40)

Intervalo de temperaturas	Número de repeticiones
88.43–88.54 °C	1 repetición
89.59–89.64 °C	2 repeticiones
89.93–90.04 °C	3 repeticiones
90.16–90.19 °C	4 repeticiones
90.24–90.33 °C	5 repeticiones

Las Figuras del 8 al 12 muestran las curvas de fusión obtenidas mediante análisis por PCR en Tiempo Real HRM para 5 locus.

Picos de Fusión

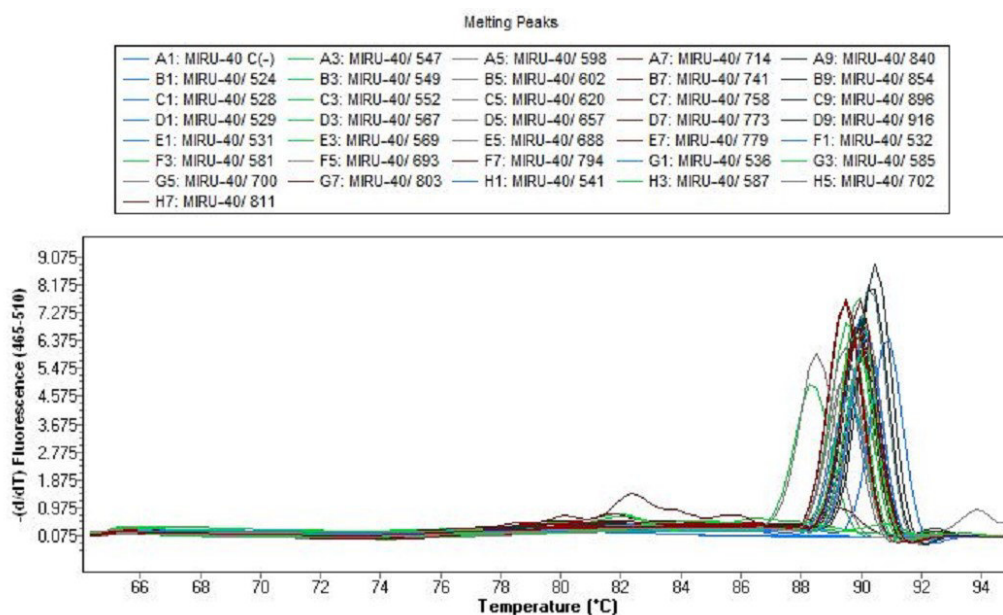


Figura 8. HRM de los productos de amplificación del locus 802 (MIRU 40) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

Picos de Fusión

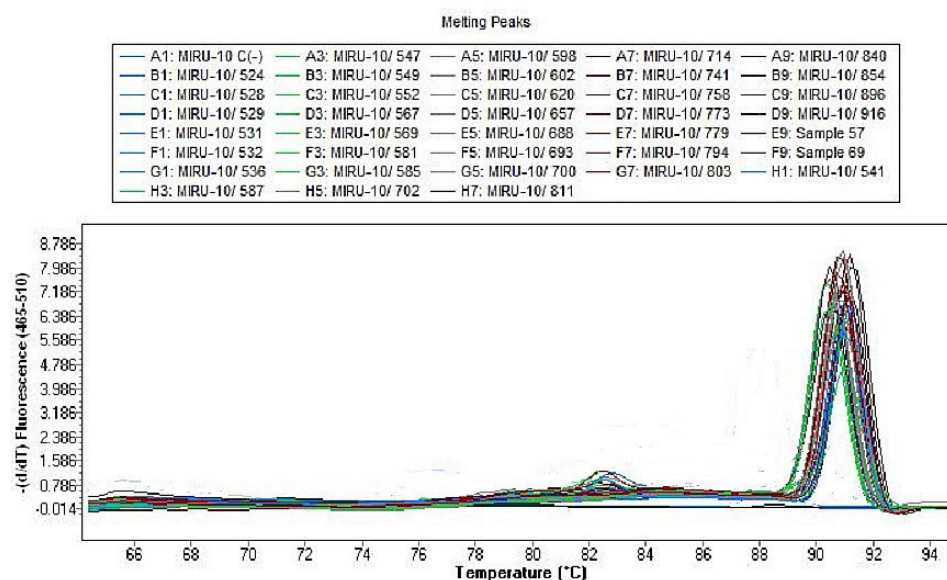


Figura 9. HRM de los productos de amplificación del locus 960 (MIRU 10) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

Picos de Fusión

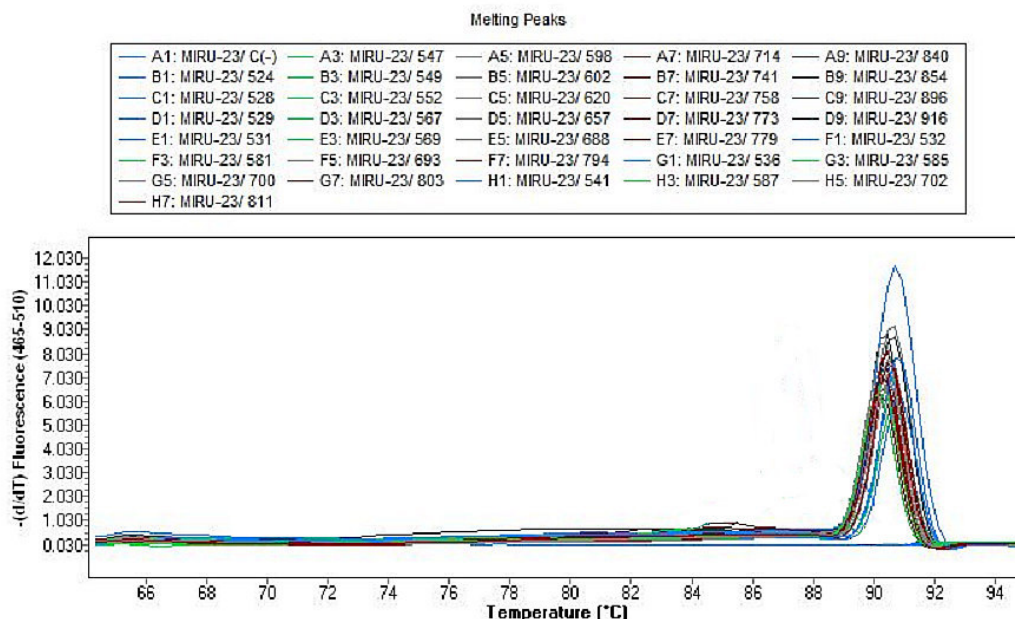


Figura 10. HRM de los productos de amplificación del locus 2531 (MIRU 23) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

Picos de Fusión

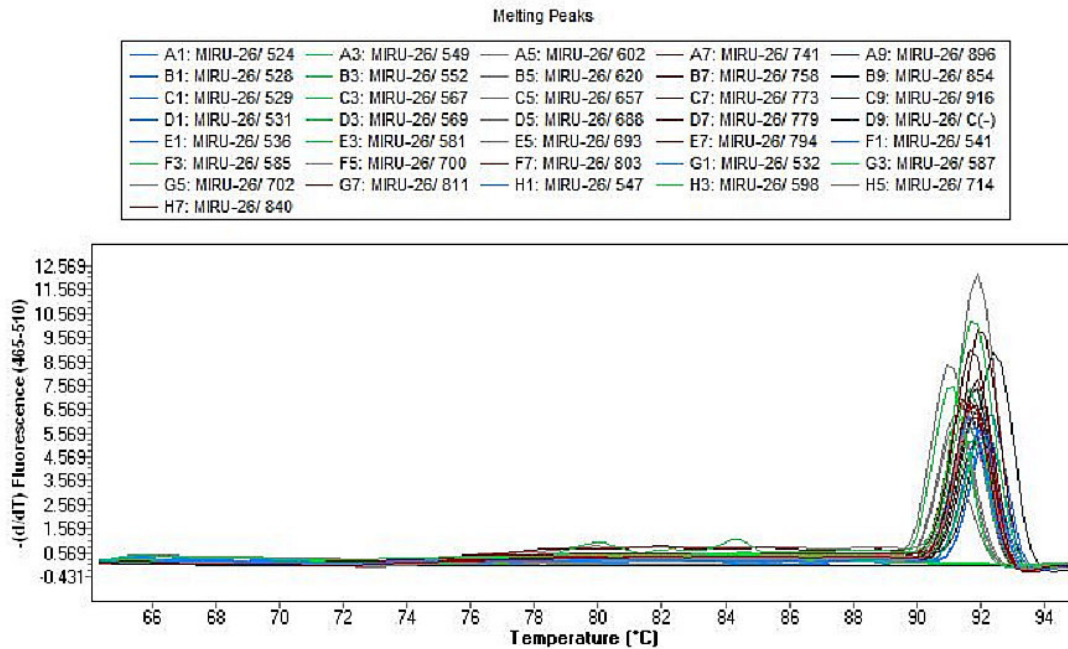


Figura 11. HRM de los productos de amplificación del locus 4052 (MIRU 26) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

Picos de Fusión

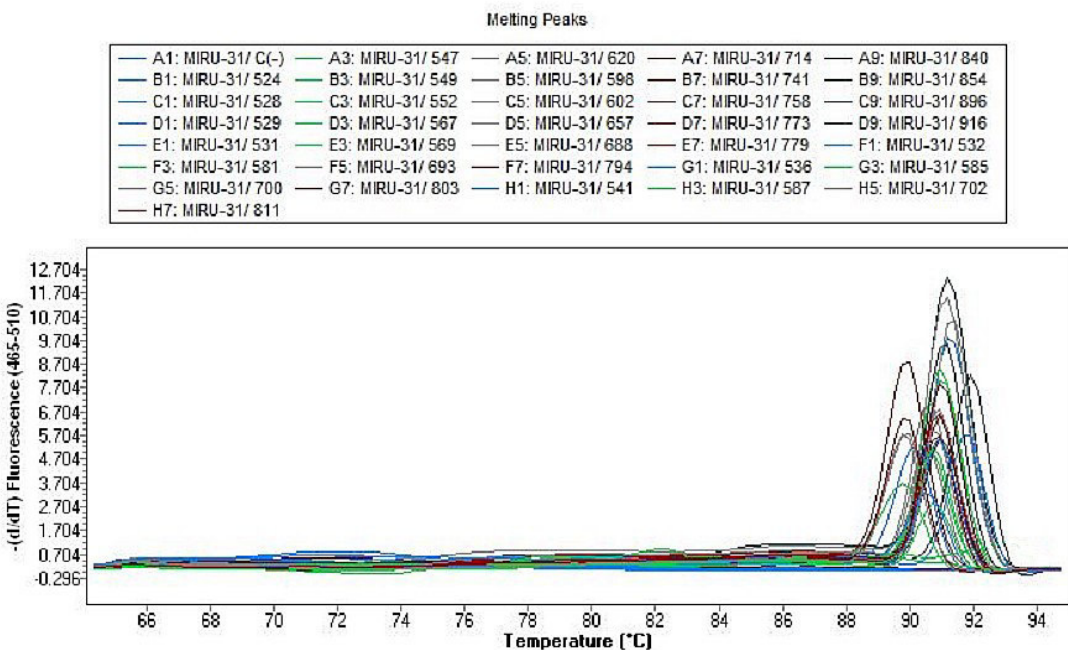


Figura 12. HRM de los productos de amplificación del locus 3192 (MIRU 31) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

5.3 Análisis por electroforesis de los productos de amplificación de los loci MIRU estudiados

La visualización de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR en Tiempo Real se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% la que separa los amplicones de acuerdo a su tamaño.

En las figuras del 13 al 15 muestran los geles de agarosa para 3 locus con los productos de amplificación obtenidos de los especímenes clínicos mediante PCR en tiempo real.

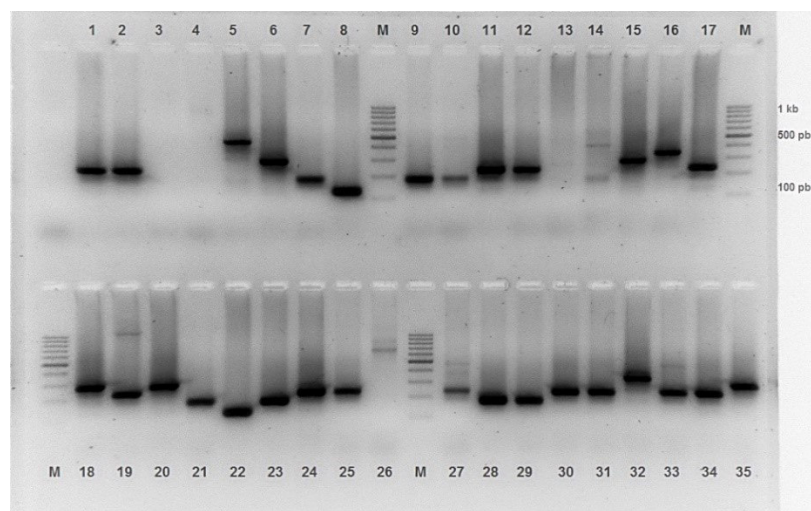


Figura 13. Electroforesis de los productos de amplificación del locus 802 (MIRU 40) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

M	Marcador de Peso Molecular	Línea 18	Muestra 620
Línea 1	Muestra 524	Línea 19	Muestra 657
Línea 2	Muestra 528	Línea 20	Muestra 688
Línea 3	Muestra 529	Línea 21	Muestra 693
Línea 4	Muestra 531	Línea 22	Muestra 700
Línea 5	Muestra 532	Línea 23	Muestra 702
Línea 6	Muestra 536	Línea 24	Muestra 714
Línea 7	Muestra 541	Línea 25	Muestra 741
Línea 8	Muestra 547	Línea 26	Muestra 758
Línea 9	Muestra 549	Línea 27	Muestra 773
Línea 10	Muestra 552	Línea 28	Muestra 779
Línea 11	Muestra 567	Línea 29	Muestra 794
Línea 12	Muestra 569	Línea 30	Muestra 803
Línea 13	Muestra 581	Línea 31	Muestra 811
Línea 14	Muestra 585	Línea 32	Muestra 840
Línea 15	Muestra 587	Línea 33	Muestra 854
Línea 16	Muestra 592	Línea 34	Muestra 896
Línea 17	Muestra 602	Línea 35	Muestra 916

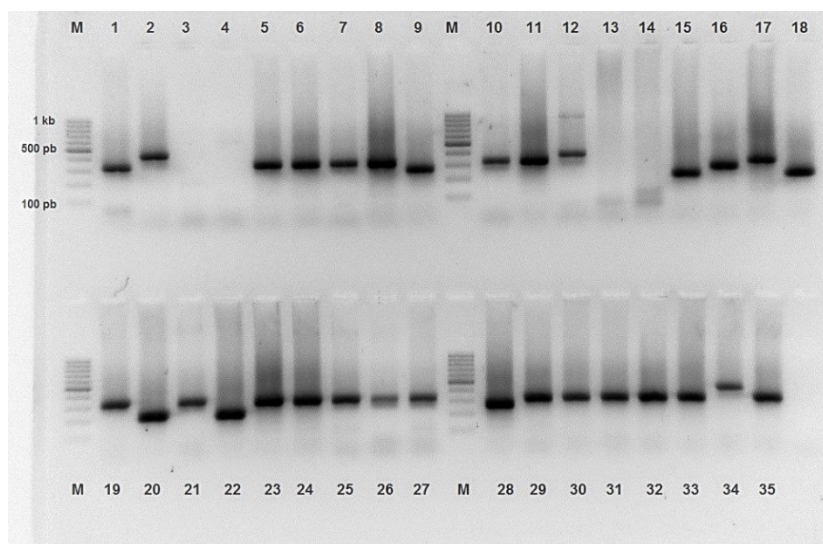


Figura 14. Electroforesis de los productos de amplificación del locus 4052 (MIRU 26) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas.

M	Marcador de Peso Molecular	Línea 18	Muestra 620
Línea 1	Muestra 524	Línea 19	Muestra 657
Línea 2	Muestra 528	Línea 20	Muestra 688
Línea 3	Muestra 529	Línea 21	Muestra 693
Línea 4	Muestra 531	Línea 22	Muestra 700
Línea 5	Muestra 532	Línea 23	Muestra 702
Línea 6	Muestra 536	Línea 24	Muestra 714
Línea 7	Muestra 541	Línea 25	Muestra 741
Línea 8	Muestra 547	Línea 26	Muestra 758
Línea 9	Muestra 549	Línea 27	Muestra 773
Línea 10	Muestra 552	Línea 28	Muestra 779
Línea 11	Muestra 567	Línea 29	Muestra 794
Línea 12	Muestra 569	Línea 30	Muestra 803
Línea 13	Muestra 581	Línea 31	Muestra 811
Línea 14	Muestra 585	Línea 32	Muestra 840
Línea 15	Muestra 587	Línea 33	Muestra 854
Línea 16	Muestra 592	Línea 34	Muestra 896
Línea 17	Muestra 602	Línea 35	Muestra 916

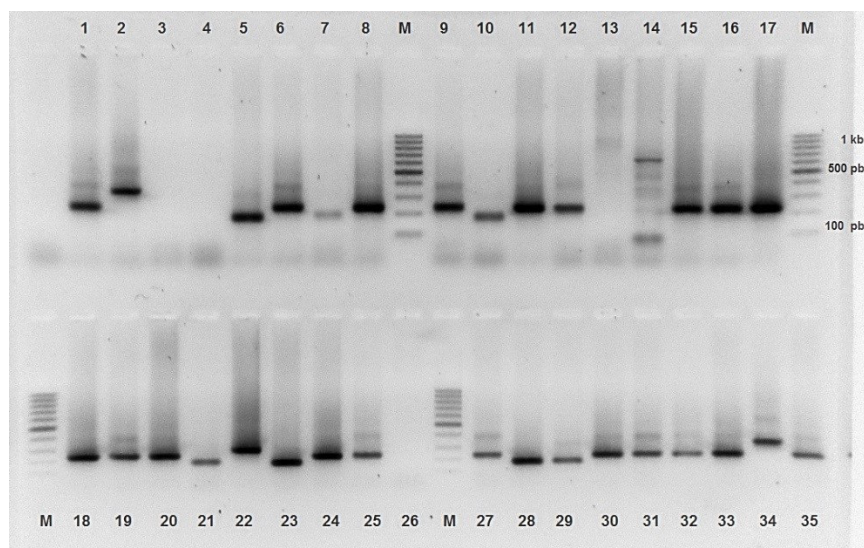


Figura 15. Electroforesis de los productos de amplificación del locus 3192 (MIRU 31) de las 35 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas..

M	Marcador de Peso Molecular	Línea 18	Muestra 620
Línea 1	Muestra 524	Línea 19	Muestra 657
Línea 2	Muestra 528	Línea 20	Muestra 688
Línea 3	Muestra 529	Línea 21	Muestra 693
Línea 4	Muestra 531	Línea 22	Muestra 700
Línea 5	Muestra 532	Línea 23	Muestra 702
Línea 6	Muestra 536	Línea 24	Muestra 714
Línea 7	Muestra 541	Línea 25	Muestra 741
Línea 8	Muestra 547	Línea 26	Muestra 758
Línea 9	Muestra 549	Línea 27	Muestra 773
Línea 10	Muestra 552	Línea 28	Muestra 779
Línea 11	Muestra 567	Línea 29	Muestra 794
Línea 12	Muestra 569	Línea 30	Muestra 803
Línea 13	Muestra 581	Línea 31	Muestra 811
Línea 14	Muestra 585	Línea 32	Muestra 840
Línea 15	Muestra 587	Línea 33	Muestra 854
Línea 16	Muestra 592	Línea 34	Muestra 896
Línea 17	Muestra 602	Línea 35	Muestra 916

5.4 Análisis de las frecuencias de los alelos de los 12 loci MIRU

Con los resultados obtenidos se calcularon las frecuencias de los diferentes alelos provenientes en el estudio y se muestran en la Tabla 7. En la tabla se muestran los alelos más frecuentemente encontrados en cada uno de los Locus MIRU, en general el número de copias MIRU variaron entre 0 y 7 copias. Los loci más polimórfico es decir aquellos que mostraron mayor variación en el número de alelos en nuestro estudio fue los Locus 960 con 7 alelos seguido del locus 802 y 2996 con 6 alelos diferentes, luego el locus 3132 con 5 alelos diferentes, seguido de los locus 154, 2531 con 3 alelos diferentes, el locus 1644, 2059 y 3007 con 2 alelos diferentes y los menos polimórficos fueron los locus 4348 y 580 con 1 alelo.

Tabla 4. Frecuencia alélica en cada locus analizado.

Copia	Locus 154	Locus 580	Locus 960	Locus 1644	Locus 2059	Locus 2531	Locus 2687	Locus 2996	Locus 3007	Locus 3192	Locus 4348	Locus 802
0		100.0%	5.7%					11.4%		14.3%		
1	17.1%		2.9%		17.1%	2.9%	100.0%		71.5%			8.6%
2	62.9%		17.1%	37.2%	82.9%					20.0%	100.0%	22.9%
3			11.4%	62.8%				11.4%	28.6%	57.2%		42.9%
4			31.5%					8.6%		2.9%		20.0%
5	7.0%		28.6%			42.9%		60.0%		5.7%		2.9%
6			2.9%			54.3%		2.9%				
7								5.7%				2.9%
8												
9												

5.5 Análisis de la diversidad alélica de los 12 loci MIRU

Para la evaluación del poder discriminativo de cada locus se calculó el valor de la diversidad alélica para cada locus. La diversidad alélica para cada locus MIRU-VNTR se clasificó como “altamente discriminatorio” cuando el valor fue > 0.6 ; como “moderadamente discriminatorio” cuando el valor fue entre $0.3 \leq y \leq 0.6$ y “pobremente discriminatorio” cuando el valor fue < 0.3 .

La Tabla 5 muestra que en nuestro estudio el locus 960 y el locus 802 son “altamente discriminativos” con valores de 0.77 y 0.71 respectivamente. Los locus “moderadamente discriminativos” son 3192, 2996, 2531, 154, 1644, 3007 y los locus “pobremente discriminativos” son 2059, 580 y 4348.

Tabla 5. Diversidad alélica para cada uno de los locus analizados.

	Locus 154	Locus 580	Locus 960	Locus 1644	Locus 2059	Locus 2531	Locus 2687	Locus 2996	Locus 3007	Locus 3192	Locus 4348	Locus 802
Valor	0.52	0.03	0.77	0.45	0.26	0.59	-0.03	0.59	0.39	0.6	0.03	0.71

5.6 Análisis de agrupamientos “Clusters”

Para el análisis de agrupamientos se usó el análisis de agrupamientos (clusters) representado con el dendrograma de similitud de los especímenes clínicos basado en los valores del número de repeticiones en tándem para cada MIRU-VNTR y el método UPGMA del programa online MIRU-VNTRplus. La Figura 16 muestra 4 grandes agrupamientos o clusters y la Tabla 5 muestra los agrupamientos derivados del dendrograma de similitud de las muestras analizadas.

El primer grupo fue el más grande y con mayor número de subgrupos, incluyó los especímenes clínicos 524, 803, 916, 536, 773, 567, 714, 840, 602, 657, 741, 811, 854, 758.

El segundo grupo incluyó los especímenes clínicos 547, 549, 598, 587, 620, 688, 700, 528, 896. El tercero incluyó a los especímenes clínicos 532, 794, 693, 702, 779, 541, 552.

El cuarto grupo fue el más pequeño con solo 4 especímenes clínicos 529, 531, 581, 585. En general utilizando los 12 locus MIRU-VNTR, se observó diversidad en los especímenes clínicos estudiados que se debe al polimorfismo de los loci MIRU-VNTR analizados.

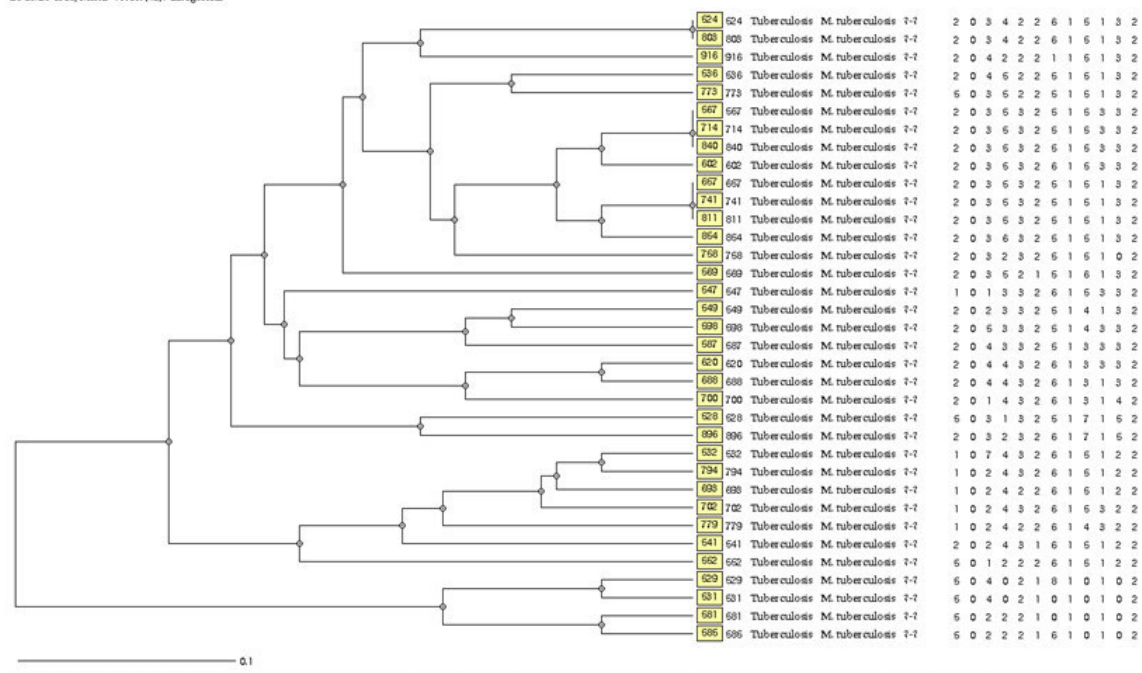


Figura 16. Agrupamientos derivados del dendrograma de similitud no enraizado de las muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas

Tabla 6. Agrupamientos derivados del dendrograma de similitud de las muestras de *Mycobacterium tuberculosis* analizadas

GRUPO	SUBGRUPO	MUESTRAS
I	S1	524, 803,916
	Subgrupo 1.1	536773
		567, 714, 840, 602
		657, 741, 811, 854
		758
	S2	
	Subgrupo 1.2	569
II	S1	
	Subgrupo 2.1	547
		549, 598
		587
		620, 688
		700
	S2	
III		532, 794
		693
		702
		779
		541
		552
IV		529, 531
		581, 585

5.7 Identificación de las cepas de los especímenes clínicos por Búsqueda de Similitud

Se identificó el linaje filogenético las cepas presentes en los especímenes clínicos por comparación con la base de datos de MIRU-VNTRplus. Se estableció un valor de distancia máxima de 0.26. La Figura 17 muestra los resultados de la identificación por búsqueda de similitud usando el programa online MIRU-VNTRplus. La Tabla 7. muestra la distribución de los linajes identificados.

MIRU-VNTRplus: Identification by Similarity Search																								
Navigate Database Edit Options Tools Help																								
<div> <div> <div>Home</div> <div>Database</div> <div>Options</div> <div>Tools</div> <div>Help</div> </div> <div> <div>Da</div> <div>Ds</div> <div>Stat</div> <div>Help</div> </div> </div>																								
<div> <div>Similarity Search Settings</div> <div> <div>Number of user strains per page: 5</div> <div>Highlight strains with different lineage</div> </div> <div> <div>For each user-strain, display the closest 5 matches.</div> <div>Do not show strains with distance greater than 0.26</div> </div> <div>Distance Measure: MIRU-VNTR [12]: Categorical</div> </div>																								
Double-click a user strain strain to change its species and lineage.																								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
0.25	524	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?	124-53	2	0	4	2	2	6	1	5	1	3	2	3								
0.25	7968/03	M. tuberculosis	LAM	124-53	2	2	4	3	2	6	1	5	3	2	3	33								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	528	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		5	0	1	3	2	5	1	7	1	5	2	3								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	529	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		5	0	0	2	1	8	1	0	1	0	2	4								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	531	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		5	0	0	2	1	0	1	0	1	0	2	4								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
0.25	532	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?	121-51	1	0	4	3	2	6	1	5	1	2	2	7								
0.25	8078/03	M. tuberculosis	LAM	121-51	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4	159							
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
0.25	536	M. tuberculosis(u)	S(m)	7-?	2	0	5	2	2	5	1	5	1	3	2	4								
0.25	3342/02	M. tuberculosis	Haarlem 86-29		2	2	5	5	1	5	1	3	2	3										
0.25	7955/03	M. tuberculosis	S	140-15	2	2	3	2	5	1	5	3	2	4	34									
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	541	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		2	0	4	3	1	6	1	5	1	2	2									
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
0.25	547	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?	127-56	1	0	3	3	2	6	1	5	3	2	1									
0.25	946/03	M. tuberculosis	LAM	127-56	1	2	2	4	2	6	1	5	3	2	1	20								
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	549	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		2	0	3	3	2	5	1	4	1	3	2									
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9	Mtbc15-9
	552	M. tuberculosis(u)	Tuberculosis(u) 7-?		5	0	2	2	2	6	1	5	1	2	1									

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
567	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 5 3 2 5 1 5 3 3 2 3	?
0.0833	2336/02	M. tuberculosis	Haarlem	82-15	50
0.0833	4130/02	M. tuberculosis	Haarlem	83-15	487
0.0833	4993/02	M. tuberculosis	Haarlem	85-15	50
0.0833	9532/03	M. tuberculosis	Haarlem	88-15	50
0.1667	3342/02	M. tuberculosis	Haarlem	86-29	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
569	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 5 2 1 5 1 6 1 3 2 3	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
581	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	5 0 2 2 1 0 1 0 1 0 2 2	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
585	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	5 0 2 2 1 6 1 0 1 0 2 2	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
587	M. tuberculosis ^(u)	UgandaI ^(m)	7-7	2 0 3 3 2 5 1 3 3 3 2 4	?
0.1667	2151/03	M. tuberculosis	S	133-15	71
0.1667	282/04	M. tuberculosis	S	135-15	34
0.25	2329/99	M. tuberculosis	UgandaI	35-15	?
0.25	11046/04	M. tuberculosis	S	131-58	?
0.25	6424/05	M. tuberculosis	S	139-60	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
598	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 3 3 2 5 1 4 3 3 2 5	?
0.1667	10469/01	M. tuberculosis	Ghana	66-25	53
0.1667	1438/02	M. tuberculosis	Ghana	66-25	53
0.1667	2570/02	M. tuberculosis	Ghana	69-25	53
0.1667	2582/02	M. tuberculosis	Ghana	70-25	53
0.1667	2597/02	M. tuberculosis	Ghana	66-25	53
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
602	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 5 3 2 6 1 5 3 3 2 3	?
0.1667	2336/02	M. tuberculosis	Haarlem	82-15	50
0.1667	4130/02	M. tuberculosis	Haarlem	83-15	487
0.1667	4993/02	M. tuberculosis	Haarlem	85-15	50
0.1667	9532/03	M. tuberculosis	Haarlem	88-15	50
0.1667	12637/02	M. tuberculosis	Haarlem	90-31	2
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
620	M. tuberculosis ^(u)	X ^(m)	7-7	2 0 4 3 2 6 1 3 3 3 2 4	?
0.1667	3995/03	M. tuberculosis	LAM	123-53	376
0.25	7968/03	M. tuberculosis	LAM	124-53	33
0.25	9953/04	M. tuberculosis	X	143-62	?
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
657	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 5 3 2 5 1 5 1 3 2 3	?
0.0833	3342/02	M. tuberculosis	Haarlem	86-29	?
0.1667	2336/02	M. tuberculosis	Haarlem	82-15	50
0.1667	4130/02	M. tuberculosis	Haarlem	83-15	487
0.1667	4993/02	M. tuberculosis	Haarlem	85-15	50
0.1667	9532/03	M. tuberculosis	Haarlem	88-15	50
Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MbC15-9	IS 6110 RFLP pattern
688	M. tuberculosis ^(u)	Tuberculosis ^(u)	7-7	2 0 4 3 2 6 1 3 1 3 2 4	?
0.25	3995/03	M. tuberculosis	LAM	123-53	376

Distance	ID	Species	Uneage	MLVA MtbcCIS-9	H37Rv	H37Ra	H37Pc	H37Mg	H37Jr	H37Ae	H37Sd	H37Nz	H37Kf	H37Lm	H37Gy	SpoIDB4 ST RD Gagneux's Uneage INH SM EMB RMP PZA IZ 6110 RFLP pattern					
	700	M. tuberculosis ^(w)	Tuberculosis ^(w)	?-?	2	0	4	3	2	6	1	3	1	4	2	1	?	?	?	?	?

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	M1000	M1004	M1005	M1006	M1007	M1008	M1009	M1010	M1011	M1012	M1013	M1014	M1015	M1016	M1017	M1018	M1019	M1020	M1021	M1022	M1023	M1024	M1025	M1026	M1027	M1028	M1029	M1030	M1031	M1032	M1033	M1034	M1035	M1036	M1037	M1038	M1039	M1040	M1041	M1042	M1043	M1044	M1045	M1046	M1047	M1048	M1049	M1050	M1051	M1052	M1053	M1054	M1055	M1056	M1057	M1058	M1059	M1060	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	M1066	M1067	M1068	M1069	M1070	M1071	M1072	M1073	M1074	M1075	M1076	M1077	M1078	M1079	M1080	M1081	M1082	M1083	M1084	M1085	M1086	M1087	M1088	M1089	M1090	M1091	M1092	M1093	M1094	M1095	M1096	M1097	M1098	M1099	M1100	M1101	M1102	M1103	M1104	M1105	M1106	M1107	M1108	M1109	M1110	M1111	M1112	M1113	M1114	M1115	M1116	M1117	M1118	M1119	M1120	M1121	M1122	M1123	M1124	M1125	M1126	M1127	M1128	M1129	M1130	M1131	M1132	M1133	M1134	M1135	M1136	M1137	M1138	M1139	M1140	M1141	M1142	M1143	M1144	M1145	M1146	M1147	M1148	M1149	M1150	M1151	M1152	M1153	M1154	M1155	M1156	M1157	M1158	M1159	M1160	M1161	M1162	M1163	M1164	M1165	M1166	M1167	M1168	M1169	M1170	M1171	M1172	M1173	M1174	M1175	M1176	M1177	M1178	M1179	M1180	M1181	M1182	M1183	M1184	M1185	M1186	M1187	M1188	M1189	M1190	M1191	M1192	M1193	M1194	M1195	M1196	M1197	M1198	M1199	M1200	M1201	M1202	M1203	M1204	M1205	M1206	M1207	M1208	M1209	M1210	M1211	M1212	M1213	M1214	M1215	M1216	M1217	M1218	M1219	M1220	M1221	M1222	M1223	M1224	M1225	M1226	M1227	M1228	M1229	M1230	M1231	M1232	M1233	M1234	M1235	M1236	M1237	M1238	M1239	M1240	M1241	M1242	M1243	M1244	M1245	M1246	M1247	M1248	M1249	M1250	M1251	M1252	M1253	M1254	M1255	M1256	M1257	M1258	M1259	M1260	M1261	M1262	M1263	M1264	M1265	M1266	M1267	M1268	M1269	M1270	M1271	M1272	M1273	M1274	M1275	M1276	M1277	M1278	M1279	M1280	M1281	M1282	M1283	M1284	M1285	M1286	M1287	M1288	M1289	M1290	M1291	M1292	M1293	M1294	M1295	M1296	M1297	M1298	M1299	M1300	M1301	M1302	M1303	M1304	M1305	M1306	M1307	M1308	M1309	M1310	M1311	M1312	M1313	M1314	M1315	M1316	M1317	M1318	M1319	M1320	M1321	M1322	M1323	M1324	M1325	M1326	M1327	M1328	M1329	M1330	M1331	M1332	M1333	M1334	M1335	M1336	M1337	M1338	M1339	M1340	M1341	M1342	M1343	M1344	M1345	M1346	M1347	M1348	M1349	M1350	M1351	M1352	M1353	M1354	M1355	M1356	M1357	M1358	M1359	M1360	M1361	M1362	M1363	M1364	M1365	M1366	M1367	M1368	M1369	M1370	M1371	M1372	M1373	M1374	M1375	M1376	M1377	M1378	M1379	M1380	M1381	M1382	M1383	M1384	M1385	M1386	M1387	M1388	M1389	M1390	M1391	M1392	M1393	M1394	M1395	M1396	M1397	M1398	M1399	M1400	M1401	M1402	M1403	M1404	M1405	M1406	M1407	M1408	M1409	M1410	M1411	M1412	M1413	M1414	M1415	M1416	M1417	M1418	M1419	M1420	M1421	M1422	M1423	M1424	M1425	M1426	M1427	M1428	M1429	M1430	M1431	M1432	M1433	M1434	M1435	M1436	M1437	M1438	M1439	M1440	M1441	M1442	M1443	M1444	M1445	M1446	M1447	M1448	M1449	M1450	M1451	M1452																																																																																																																																																																																																	
	714	M. tuberculosis ⁽⁴⁾	Tuberculosis ⁽⁴⁾	7-7	2	0	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

[illegible]

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	SpolB4	ST	RD	Gagneux's Lineage	INH	SM	EMB	RMP	FZA	IS 6110 RFLP pattern								
	758	M. tuberculosis ⁽⁴⁾	Tuberculosis ⁽⁴⁾	7-7	2	0	2	3	2	5	1	5	1	0	2	3		?	?	?	?	?
0.25	3342/02	M. tuberculosis	Haarlem	86-29	2	2	5	3	2	5	1	5	1	3	2	3		r	s	r	r	s
0.25	4192/03	M. tuberculosis	Haarlem	89-15	2	2	3	3	2	5	1	5	1	3	2	3	50	s	s	s	s	s
0.25	10459/03	M. tuberculosis	NEW-1	158-66	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3	127	s	s	s	s	s

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	IS6110	RD	Gagneux's Lineage	INH	S	EMB	RMP	PZA	IS 6110 RFLP pattern							
	773	M. tuberculosis ⁽⁴⁾	Tuberculosis ⁽⁴⁾	?-?	5	0	2	2	5	1	5	1	3	2	3	?	?	?	?	?
0.25	3342/02	M. tuberculosis	Haarlem	86-29	2	2	5	3	2	5	1	5	1	3	2	3	r	s	r	s

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	MLVA 16	MLVA 17	MLVA 18	MLVA 19	MLVA 20	MLVA 21	MLVA 22	MLVA 23	MLVA 24	MLVA 25	MLVA 26	MLVA 27	MLVA 28	MLVA 29	MLVA 30	MLVA 31	MLVA 32	MLVA 33	MLVA 34	MLVA 35	MLVA 36	MLVA 37	MLVA 38	MLVA 39	MLVA 40	MLVA 41	MLVA 42	MLVA 43	MLVA 44	MLVA 45	MLVA 46	MLVA 47	MLVA 48	MLVA 49	MLVA 50	MLVA 51	MLVA 52	MLVA 53	MLVA 54	MLVA 55	MLVA 56	MLVA 57	MLVA 58	MLVA 59	MLVA 60	MLVA 61	MLVA 62	MLVA 63	MLVA 64	MLVA 65	MLVA 66	MLVA 67	MLVA 68	MLVA 69	MLVA 70	MLVA 71	MLVA 72	MLVA 73	MLVA 74	MLVA 75	MLVA 76	MLVA 77	MLVA 78	MLVA 79	MLVA 80	MLVA 81	MLVA 82	MLVA 83	MLVA 84	MLVA 85	MLVA 86	MLVA 87	MLVA 88	MLVA 89	MLVA 90	MLVA 91	MLVA 92	MLVA 93	MLVA 94	MLVA 95	MLVA 96	MLVA 97	MLVA 98	MLVA 99	MLVA 100	MLVA 101	MLVA 102	MLVA 103	MLVA 104	MLVA 105	MLVA 106	MLVA 107	MLVA 108	MLVA 109	MLVA 110	MLVA 111	MLVA 112	MLVA 113	MLVA 114	MLVA 115	MLVA 116	MLVA 117	MLVA 118	MLVA 119	MLVA 120	MLVA 121	MLVA 122	MLVA 123	MLVA 124	MLVA 125	MLVA 126	MLVA 127	MLVA 128	MLVA 129	MLVA 130	MLVA 131	MLVA 132	MLVA 133	MLVA 134	MLVA 135	MLVA 136	MLVA 137	MLVA 138	MLVA 139	MLVA 140	MLVA 141	MLVA 142	MLVA 143	MLVA 144	MLVA 145	MLVA 146	MLVA 147	MLVA 148	MLVA 149	MLVA 150	MLVA 151	MLVA 152	MLVA 153	MLVA 154	MLVA 155	MLVA 156	MLVA 157	MLVA 158	MLVA 159	MLVA 160	MLVA 161	MLVA 162	MLVA 163	MLVA 164	MLVA 165	MLVA 166	MLVA 167	MLVA 168	MLVA 169	MLVA 170	MLVA 171	MLVA 172	MLVA 173	MLVA 174	MLVA 175	MLVA 176	MLVA 177	MLVA 178	MLVA 179	MLVA 180	MLVA 181	MLVA 182	MLVA 183	MLVA 184	MLVA 185	MLVA 186	MLVA 187	MLVA 188	MLVA 189	MLVA 190	MLVA 191	MLVA 192	MLVA 193	MLVA 194	MLVA 195	MLVA 196	MLVA 197	MLVA 198	MLVA 199	MLVA 200	MLVA 201	MLVA 202	MLVA 203	MLVA 204	MLVA 205	MLVA 206	MLVA 207	MLVA 208	MLVA 209	MLVA 210	MLVA 211	MLVA 212	MLVA 213	MLVA 214	MLVA 215	MLVA 216	MLVA 217	MLVA 218	MLVA 219	MLVA 220	MLVA 221	MLVA 222	MLVA 223	MLVA 224	MLVA 225	MLVA 226	MLVA 227	MLVA 228	MLVA 229	MLVA 230	MLVA 231	MLVA 232	MLVA 233	MLVA 234	MLVA 235	MLVA 236	MLVA 237	MLVA 238	MLVA 239	MLVA 240	MLVA 241	MLVA 242	MLVA 243	MLVA 244	MLVA 245	MLVA 246	MLVA 247	MLVA 248	MLVA 249	MLVA 250	MLVA 251	MLVA 252	MLVA 253	MLVA 254	MLVA 255	MLVA 256	MLVA 257	MLVA 258	MLVA 259	MLVA 260	MLVA 261	MLVA 262	MLVA 263	MLVA 264	MLVA 265	MLVA 266	MLVA 267	MLVA 268	MLVA 269	MLVA 270	MLVA 271	MLVA 272	MLVA 273	MLVA 274	MLVA 275	MLVA 276	MLVA 277	MLVA 278	MLVA 279	MLVA 280	MLVA 281	MLVA 282	MLVA 283	MLVA 284	MLVA 285	MLVA 286	MLVA 287	MLVA 288	MLVA 289	MLVA 290	MLVA 291	MLVA 292	MLVA 293	MLVA 294	MLVA 295	MLVA 296	MLVA 297	MLVA 298	MLVA 299	MLVA 300	MLVA 301	MLVA 302	MLVA 303	MLVA 304	MLVA 305	MLVA 306	MLVA 307	MLVA 308	MLVA 309	MLVA 310	MLVA 311	MLVA 312	MLVA 313	MLVA 314	MLVA 315	MLVA 316	MLVA 317	MLVA 318	MLVA 319	MLVA 320	MLVA 321	MLVA 322	MLVA 323	MLVA 324	MLVA 325	MLVA 326	MLVA 327	MLVA 328	MLVA 329	MLVA 330	MLVA 331	MLVA 332	MLVA 333	MLVA 334	MLVA 335	MLVA 336	MLVA 337	MLVA 338	MLVA 339	MLVA 340	MLVA 341	MLVA 342	MLVA 343	MLVA 344	MLVA 345	MLVA 346	MLVA 347	MLVA 348	MLVA 349	MLVA 350	MLVA 351	MLVA 352	MLVA 353	MLVA 354	MLVA 355	MLVA 356	MLVA 357	MLVA 358	MLVA 359	MLVA 360	MLVA 361	MLVA 362	MLVA 363	MLVA 364	MLVA 365	MLVA 366	MLVA 367	MLVA 368	MLVA 369	MLVA 370	MLVA 371	MLVA 372	MLVA 373	MLVA 374	MLVA 375	MLVA 376	MLVA 377	MLVA 378	MLVA 379	MLVA 380	MLVA 381	MLVA 382	MLVA 383	MLVA 384	MLVA 385	MLVA 386	MLVA 387	MLVA 388	MLVA 389	MLVA 390	MLVA 391	MLVA 392	MLVA 393	MLVA 394	MLVA 395	MLVA 396	MLVA 397	MLVA 398	MLVA 399	MLVA 400	MLVA 401	MLVA 402	MLVA 403	MLVA 404	MLVA 405	MLVA 406	MLVA 407	MLVA 408	MLVA 409	MLVA 410	MLVA 411	MLVA 412	MLVA 413	MLVA 414	MLVA 415	MLVA 416	MLVA 417	MLVA 418	MLVA 419	MLVA 420	MLVA 421	MLVA 422	MLVA 423	MLVA 424	MLVA 425	MLVA 426	MLVA 427	MLVA 428	MLVA 429	MLVA 430	MLVA 431	MLVA 432	MLVA 433	MLVA 434	MLVA 435	MLVA 436	MLVA 437	MLVA 438	MLVA 439	MLVA 440	MLVA 441	MLVA 442	MLVA 443	MLVA 444	MLVA 445	MLVA 446	MLVA 447	MLVA 448	MLVA 449	MLVA 450	MLVA 451	MLVA 452	MLVA 453	MLVA 454	MLVA 455	MLVA 456	MLVA 457	MLVA 458	MLVA 459	MLVA 460	MLVA 461	MLVA 462	MLVA 463	MLVA 464	MLVA 465	MLVA 466	MLVA 467	MLVA 468	MLVA 469	MLVA 470	MLVA 471	MLVA 472	MLVA 473	MLVA 474	MLVA 475	MLVA 476	MLVA 477	MLVA 478	MLVA 479	MLVA 480	MLVA 481	MLVA 482	MLVA 483	MLVA 484	MLVA 485	MLVA 486	MLVA 487	MLVA 488	MLVA 489	MLVA 490	MLVA 491	MLVA 492	MLVA 493	MLVA 494	MLVA 495	MLVA 496	MLVA 497	MLVA 498	MLVA 499	MLVA 500	MLVA 501	MLVA 502	MLVA 503	MLVA 504	MLVA 505	MLVA 506	MLVA 507	MLVA 508	MLVA 509	MLVA 510	MLVA 511	MLVA 512	MLVA 513	MLVA 514	MLVA 515	MLVA 516	MLVA 517	MLVA 518	MLVA 519	MLVA 520	MLVA 521	MLVA 522	MLVA 523	MLVA 524	MLVA 525	MLVA 526	MLVA 527	MLVA 528	MLVA 529	MLVA 530	MLVA 531	MLVA 532	MLVA 533	MLVA 534	MLVA 535	MLVA 536	MLVA 537	MLVA 538	MLVA 539	MLVA 540	MLVA 541	MLVA 542	MLVA 543	MLVA 544	MLVA 545	MLVA 546	MLVA 547	MLVA 548	MLVA 549	MLVA 550	MLVA 551	MLVA 552	MLVA 553	MLVA 554	MLVA 555	MLVA 556	MLVA 557	MLVA 558	MLVA 559	MLVA 560	MLVA 561	MLVA 562	MLVA 563	MLVA 564	MLVA 565	MLVA 566	MLVA 567	MLVA 568	MLVA 569	MLVA 570	MLVA 571	MLVA 572	MLVA 573	MLVA 574	MLVA 575	MLVA 576	MLVA 577	MLVA 578	MLVA 579	MLVA 580	MLVA 581	MLVA 582	MLVA 583	MLVA 584	MLVA 585	MLVA 586	MLVA 587	MLVA 588	MLVA 589	MLVA 590	MLVA 591	MLVA 592	MLVA 593	MLVA 594	MLVA 595	MLVA 596	MLVA 597	MLVA 598	MLVA 599	MLVA 600	MLVA 601	MLVA 602	MLVA 603	MLVA 604	MLVA 605	MLVA 606	MLVA 607	MLVA 608	MLVA 609	MLVA 610	MLVA 611	MLVA 612	MLVA 613	MLVA 614	MLVA 615	MLVA 616	MLVA 617	MLVA 618	MLVA 619	MLVA 620	MLVA 621	MLVA 622	MLVA 623	MLVA 624	MLVA 625	MLVA 626	MLVA 627	MLVA 628	MLVA 629	MLVA 630	MLVA 631	MLVA 632	MLVA 633	MLVA 634	MLVA 635	MLVA 636	MLVA 637	MLVA 638	MLVA 639	MLVA 640	MLVA 641	MLVA 642	MLVA 643	MLVA 644	MLVA 645	MLVA 646	MLVA 647	MLVA 648	MLVA 649	MLVA 650	MLVA 651	MLVA 652	MLVA 653	MLVA 654	MLVA 655	MLVA 656	MLVA 657	MLVA 658	MLVA 659	MLVA 660	MLVA 661	MLVA 662	MLVA 663	MLVA 664	MLVA 665	MLVA 666	MLVA 667	MLVA 668	MLVA 669	MLVA 670	MLVA 671	MLVA 672	MLVA 673	MLVA 674	MLVA 675	MLVA 676	MLVA 677	MLVA 678	MLVA 679	MLVA 680	MLVA 681	MLVA 682	MLVA 683	MLVA 684	MLVA 685	MLVA 686	MLVA 687	MLVA 688	MLVA 689	MLVA 690	MLVA 691	MLVA 692	MLVA 693	MLVA 694	MLVA 695	MLVA 696	MLVA 697	MLVA 698	MLVA 699	MLVA 700	MLVA 701	MLVA 702	MLVA 703	MLVA 704	MLVA 705	MLVA 706	MLVA 707	MLVA 708	MLVA 709	MLVA 710	MLVA 711	MLVA 712	MLVA 713	MLVA 714	MLVA 715	MLVA 716	MLVA 717	MLVA 718	MLVA 719	MLVA 720	MLVA 721	MLVA 722	MLVA 723	MLVA 724	MLVA 725	MLVA 726	MLVA 727	MLVA 728	MLVA 729	MLVA 730	MLVA 731	MLVA 732	MLVA 733	MLVA 734	MLVA 735	MLVA 736	MLVA 737	MLVA 738	MLVA 739	MLVA 740	MLVA 741	MLVA 742	MLVA 743	MLVA 744	MLVA 745	MLVA 746	MLVA 747	MLVA 748	MLVA 749	MLVA 750	MLVA 751	MLVA 752	MLVA 753	MLVA 754	MLVA 755	MLVA 756	MLVA 757	MLVA 758	MLVA 759	MLVA 760	MLVA 761	MLVA 762	MLVA 763	MLVA 764	MLVA 765	MLVA 766	MLVA 767	MLVA 768	MLVA 769	MLVA 770	MLVA 771	MLVA 772	MLVA 773	MLVA 774	MLVA 775	MLVA 776	MLVA 777	MLVA 778	MLVA 779	MLVA 780	MLVA 781	MLVA 782	MLVA 783	MLVA 784	MLVA 785	MLVA 786	MLVA 787	MLVA 788	MLVA 789	MLVA 790	MLVA 791	MLVA 792	MLVA 793	MLVA 794	MLVA 795	MLVA 796	MLVA 797	MLVA 798	MLVA 799	MLVA 800	MLVA 801	MLVA 802	MLVA 803	MLVA 804	MLVA 805	MLVA 806	MLVA 807	MLVA 808	MLVA 809	MLVA 810	MLVA 811	MLVA 812	MLVA 813	MLVA 814	MLVA 815	MLVA 816	MLVA 817	MLVA 818	MLVA 819	MLVA 820	MLVA 821	MLVA 822	MLVA 823	MLVA 824	MLVA 825	MLVA 826	MLVA 827	MLVA 828	MLVA 829	MLVA 830	MLVA 831	MLVA 832	MLVA 833	MLVA 834	MLVA 835	MLVA 836	MLVA 837	MLVA 838	MLVA 839	MLVA 840	MLVA 841	MLVA 842	MLVA 843	MLVA 844	MLVA 845	MLVA 846	MLVA 847	MLVA 848	MLVA 849	MLVA 850	MLVA 851	MLVA 852	MLVA 853	MLVA 854	MLVA 855	MLVA 856	MLVA 857	MLVA 858	MLVA 859	MLVA 860	MLVA 861	MLVA 862	MLVA 863	MLVA 864	MLVA 865	MLVA 866	MLVA 867	MLVA 868	MLVA 869	MLVA 870	MLVA 871	MLVA 872	MLVA 873	MLVA 874	MLVA 875	MLVA 876	MLVA 877	MLVA 878	MLVA 879	MLVA 880	MLVA 881	MLVA 882	MLVA 883	MLVA 884	MLVA 885	MLVA 886	MLVA 887	MLVA 888	MLVA 889	MLVA 890	MLVA 891	MLVA 892	MLVA 893	MLVA 894	MLVA 895	MLVA 896	MLVA 897	MLVA 898	MLVA 899	MLVA 900	MLVA 901	MLVA 902	MLVA 903	MLVA 904	MLVA 905	MLVA 906	MLVA 907	MLVA 908	MLVA 909	MLVA 910	MLVA 911	MLVA 912	MLVA 913	MLVA 914	MLVA 915	MLVA 916	MLVA 917	MLVA 918	MLVA 919	MLVA 920	MLVA 921	MLVA 922	MLVA 923	MLVA 924	MLVA 925	MLVA 926	MLVA 927	MLVA 928	MLVA 929	MLVA 930	MLVA 931	MLVA 932	MLVA 933	MLVA 934	MLVA 935	MLVA 936	MLVA 937	MLVA 938	MLVA 939	MLVA 940	MLVA 941	MLVA 942	MLVA 943	MLVA 944	MLVA 945	MLVA 946	MLVA 947	MLVA 948	MLVA 949	MLVA 950	MLVA 951	MLVA 952	MLVA 953	MLVA 954	MLVA 955	MLVA 956	MLVA 957	MLVA 958	MLVA 959	MLVA 960	MLVA 961	MLVA 962	MLVA 963	MLVA 964	MLVA 965	MLVA 966	MLVA 967	MLVA 968	MLVA 969	MLVA 970	MLVA 971	MLVA 972	MLVA 973	MLVA 974	MLVA 975	MLVA 976	MLVA 977	MLVA 978	MLVA 979	MLVA 980	MLVA 981	MLVA 982	MLVA 983	MLVA 984	MLVA 985	MLVA 986	MLVA 987	MLVA 988	MLVA 989	MLVA 990	MLVA 991	MLVA 992	MLVA 993	MLVA 994	MLVA 995	MLVA 996	MLVA 997	MLVA 998	MLVA 999	MLVA 1000	MLVA 1001	MLVA 1002	MLVA 1003	MLVA 1004	MLVA 1005	MLVA 1006	MLVA 1007	MLVA 1008	MLVA 1009	MLVA 1010	MLVA 1011	MLVA 1012	MLVA 1013	MLVA 1014	MLVA 1015	MLVA 1016	MLVA 1017	MLVA 1018	MLVA 1019	MLVA 1020	MLVA 1021	MLVA 1022	MLVA 1023	MLVA 1024	MLVA 1025	MLVA 1026	MLVA 1027	MLVA 1028	MLVA 1029	MLVA 1030	MLVA 1031	MLVA 1032	MLVA 1033	MLVA 1034	MLVA 1035	MLVA 1036	MLVA 1037	MLVA 1038	MLVA 1039	MLVA 1040	MLVA 1041	MLVA 1042	MLVA 1043	MLVA 1044	MLVA 1045	MLVA 1046	MLVA 1047	MLVA 1048	MLVA 1049	MLVA 1050	MLVA 1051	MLVA 1052	MLVA 1053	MLVA 1054	MLVA 1055	MLVA 1056	MLVA 1057	MLVA 1058	MLVA 1059	MLVA 1060	MLVA 1061	MLVA 1062	MLVA 1063	MLVA 1064	MLVA 1065	MLVA 1066	MLVA 1067	MLVA 1068	MLVA 1069	MLVA 1070	MLVA 1071	MLVA 1072	MLVA 1073	MLVA 1074	MLVA 1075	MLVA 1076	MLVA 1077	MLVA 1078	MLVA 1079	MLVA 1080	MLVA 1081	MLVA 1082	MLVA 1083	MLVA 1084	MLVA 1085	MLVA 1086	MLVA 1087	MLVA 1088	MLVA 1089	MLVA 1090	MLVA 1091	MLVA 1092	MLVA 1093	MLVA 1094	MLVA 1095	MLVA 1096	MLVA 1097	MLVA 1098	MLVA 1099	MLVA 1100	MLVA 1101	MLVA 1102	MLVA 1103	MLVA 1104	MLVA 1105	MLVA 1106	MLVA 1107	MLVA 1108	MLVA 1109	MLVA 1110	MLVA 1111	MLVA 1112	MLVA 1113	MLVA 1114	MLVA 1115	MLVA 1116	MLVA 1117	MLVA 1118	MLVA 1119	MLVA 1120	MLVA 1121	MLVA 1122	MLVA 1123	MLVA 1124	MLVA 1125	MLVA 1126	MLVA 1127	MLVA 1128	MLVA 1129	MLVA 1130	MLVA 1131	MLVA 1132	MLVA 1
----------	----	---------	---------	---------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	--------

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	SpoID84 ST RD Gagneux's Lineage INH SM EMB RMP PZA	IS 6110 RFLP pattern
794	M. tuberculosis ⁽⁴⁾	Tuberculosis ⁽⁴⁾	?-?	1 0 4 3 2 6 1 5 1 2 2 2 2	? ? ? ? ?	
0.25	8078/03 M. tuberculosis	LAM	121-51	1 2 4 3 2 6 1 5 3 2 2 4	159	s s s s s

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA Mtbc15-9	SpolDB4 ST	RD Gagneux's Lineage	INH	SM	EMB	RMP	PZA	T5 6110 RFLP pattern
803	M. tuberculosis ⁽⁴⁾	Tuberculosis ⁽⁴⁾	?-?	2 0 4 2 2 6 1 5 1 3 2 3								?? ? ? ?
0.25	7968/03 M. tuberculosis	LAM	124-53	2 2 4 3 2 6 1 5 3 3 2 3	33							g g s s g

5.8 Identificación del linaje mediante al uso del algoritmo “Neighbour joining”

Se realizaron 2 análisis adicionales con el programa “online” MIRU-VNTRplus debido a que el análisis por similitud no fue suficiente para identificar todas las cepas de las muestras. La Figura 18 muestra un árbol radial NJ-Tree MIRU_VNTR en el que aparecen todas las cepas de las muestras de especímenes clínicos y las cepas de las bases de datos del programa *online* MIRU-VNTR plus. Este formato que se caracteriza por agrupar cepas relacionadas. Se observa un grupo conformado por 22 especímenes clínicos se relacionan con la cepas Haarlem, luego le sigue otro grupo de 10 especímenes clínicos que se relacionan con las cepas LAM y por ultimo un grupo pequeño de 3 especímenes clínicos que se relacionan con las cepas Ghana.

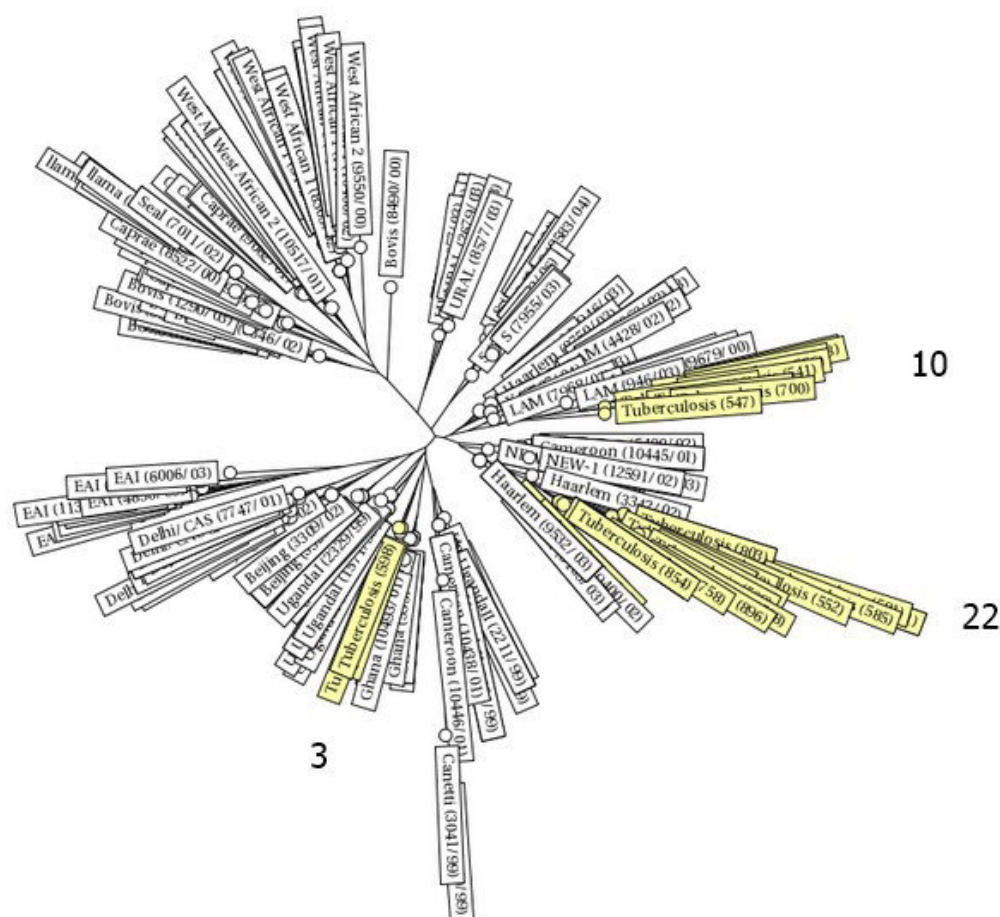


Figura 18. Identificación de las cepas de los especímenes clínicos usando las cepas de referencia de MIRU-VNTRplus.org. Se construyó un árbol radial usando los datos de tipificación de los 12 locus MIRU-VNTR. Los números indican la cantidad de especímenes clínicos agrupados.

La figura 19. muestra el dendrograma que se generó usando el algoritmo “Neighbour joining” (MIRU-VNTRplus: Tree-based Identification) basado en los patrones de identificación de 12 locus MIRU-VNTR obtenidos mediante el análisis HRM de los productos de amplificación luego del PCR en tiempo real. Se utilizó el algoritmo “Neighbour-joining” y se incluyó en el árbol NJ-tree el número de copias VNTR de cada locus analizado. Este árbol identifica claramente todas las cepas de

las muestras clínicas y las cepas de referencia del programa online MIRU-VNTRplus. El grupo más numeroso tiene 22 cepas de especímenes clínicos corresponden al linaje Haarlem. El segundo grupo con 10 cepas de especímenes clínicos corresponde al linaje LAM y el último grupo con 3 cepas de especímenes clínicos corresponde al linaje Ghana.

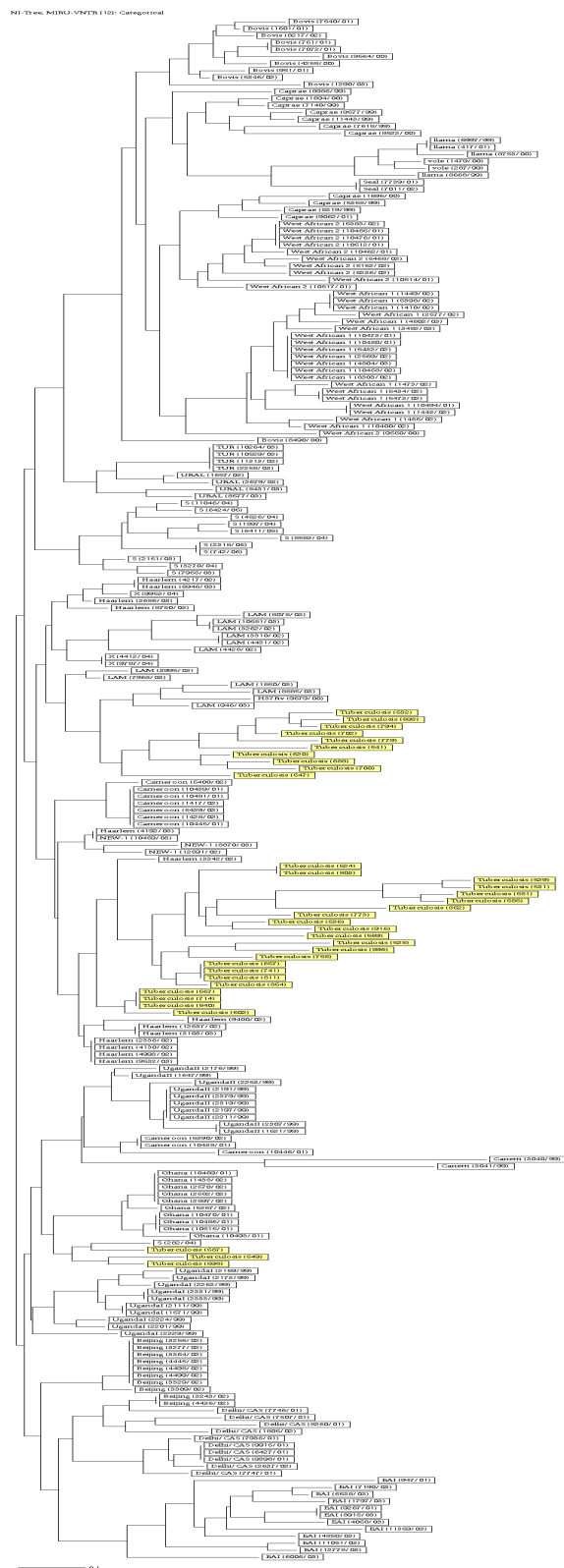


Figura 19. Dendrograma con el algoritmo “Neighbour joining” (MIRU-VNTRplus).

VI. Discusión de los resultados

El método de las Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas-Número variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR) es uno de los métodos más importantes que ha sido usado recientemente para la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Ha sido usado en los estudios epidemiológicos de tuberculosis en los países desarrollados, pero este tipo de estudio es muy escaso en los países en desarrollo. Particularmente hay muy pocos estudios de esta naturaleza en el Perú (Barletta *et.al.*, 2013; Iwamoto *et.al.*, 2012). Barletta *et. al.*, investigó la diversidad genética entre complejo *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en pacientes sin factores de riesgo conocidos para tuberculosis multidrogorresistente en una zona alta carga de MDR y analizó la relación entre los genotipos, primaria resistencia a los medicamentos y la edad. Encontró que en contraste con otros países de América Latina, donde el linaje LAM es el más predominante, encontró que el más común es el espoligotipo 50 del linaje Haarlem. Ninguno de los linajes prevalentes mostró una asociación significativa con la edad o la resistencia a la isoniazida y / o la rifampicina. Iwamoto *et.al.* estudió la diversidad genética y las características de la transmisión de las cepas Beijing en Perú usando 15 loci MIRU-VNTR más 9 loci adicionales optimizados para las cepas Beijing. Con los 24 loci VNTR enocontró una alta tasa de agrupamiento agrupamiento (80,3%) y un índice de transmisión reciente alta (RTI (n-1) = 0,707). Estos datos sugirieron una transmisión activa y en curso de transmisión de cepas de la familia Beijing en el área de estudio. Las comparaciones con los datos procedentes de Asia Oriental sugirieron que el genotipo surgió como un clon endémico únicamente en el Perú.

Hay 2 métodos para determinar el tamaño de los amplicones, la electroforesis en gel de agarosa (Blackwood *et.al.*, 2004; Mathema *et.al.*, 2006) y la electroforesis capilar (Allix *et.al.*, 2004; Sun *et.al.*, 2004). En el primero, los tamaños de los amplicones se miden con un análisis tipo huella digital con el uso de un “software” o por comparación visual con un estándar marcador de ADN después de la electroforesis en gel de agarosa. Si bien se sabe que la electroforesis en agarosa

es un método es barato y simple, existen varios factores pueden influir en los resultados definitivos, siendo los más importantes la distorsión de los carriles durante electroforesis resultando en malas estimaciones del tamaño del fragmento (Le Fleche *et.al.*, 2002). Además, es difícil obtener en número preciso de las repeticiones en tándem lo cual puede dar lugar a resultados diferentes para la misma cepa. La electroforesis capilar al contrario tiene una capacidad potente para medir el tamaño de los fragmentos en un solo experimento sin las deficiencias antes mencionadas (Takashima & Iwamoto, 2006)). Sin embargo, sus requisitos de gastos y de equipos han limitado su aplicación.

En el presente estudio elegimos explorar un nuevo método para detectar el tamaño de los productos de amplificación que se basa en el análisis de alta resolución del punto de fusión (HRM) para evaluar la eficiencia de este nuevo método para la genotipificación de cepas encontradas en 35 especímenes clínicos de pacientes del Laboratorio San Fernando del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

La evaluación del análisis de alta resolución de la curva de fusión (HRMA) combinado con el PCR en Tiempo Real como un método de tipificación de 12 loci MIRU-VNTR propuesto en este estudio representa una aproximación novedosa para la genotipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de especímenes clínicos. Este utiliza un PCR en Tiempo Real con “primers” o cebadores para los locus MIRU y para el manejo rápido de los datos de genotipificación.

La bibliografía revela que la genotipificación con MIRU-VNTR es reproducible, sensible y específica para aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, rendimiento que no ha sido alcanzado por ningún otro método utilizado con propósitos de genotipificación, incluyendo RFLP IS6110, probado en las mismas condiciones (Cohn, 1998). Es más, el poder de discriminación de la genotipificación por MIRU-VNTR rindió mejor que otros métodos basados en RFLP u otros métodos

basados en tipificación por PCR-IS6110- independiente (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Kremer & Van Soolingen, 1999).

En nuestro estudio los resultados muestran que el análisis de alta resolución de la curva de fusión combinado con el PCR en Tiempo Real es capaz de suministrar datos precisos del número de repeticiones en tándem de los locus MIRU-VNTR en especímenes clínicos para su posterior identificación utilizando el programa online MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org).

Enfocándonos en lo que se refiere a la identificación de los alelos MIRU-VNTR, de los 12 loci estudiados unos resultaron ser más discriminativos que otros. En nuestro estudio el locus 960 y el locus 802 son “altamente discriminativos. Los locus “moderadamente discriminativos” son 3192, 2996, 2531, 154, 1644, 3007 y los locus “pobremente discriminativos” son 2059, 580 y 4348. Noda *et.al*, 2008 en un estudio con aislados clínicos del estado de Paraná reportan los locus 802, 2531, 960, 1644 como altamente discriminativos. Por el contrario, Kovalev *et.al*. 2005 (113) observaron la mayor diversidad alélica para los loci 2996, 3192 y 960 en aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de los Urales región de la Federación Rusa. Sharma *et.al*. 2008 (114), en un estudio de los aislados de Kanpur, India, y trabajando con sólo seis loci MIRU observó que los loci más discriminatorio fueron, por orden de diversidad, 2006, 960, 1644 y 802. Los estudios antes mencionados y otras investigaciones (Asensios, *et.al.*, 2009; Gagneux *et.al.*, 2006., Candia *et.al.*, 2007; Abadia *et.al.*, 2009), coinciden con nuestros resultados donde el locus 960 y el locus 802 son altamente discriminativo.

El análisis de agrupamiento o “cluster” representado en el dendrograma de similitud de las cepas de los especímenes clínicos evaluado con el método UPGMA, nos muestra, en general 4 agrupamientos.

En general utilizando los 12 locus MIRU-VNTR, en el presente trabajo se observó diversidad en las cepas presentes en los especímenes clínicos estudiados. En términos de epidemiología molecular esta información es valiosa para el estudio de

la distribución clonal del *Mycobacterium tuberculosis* en nuestra población. Gracias a estos datos y en análisis conjunto con otros se podría agrupar patrones genéticos, estudiar focos infecciosos y determinar posible transmisión activa. La identificación del linaje con MIRU-VNTR se ve facilitada por la base de datos MIRU-VNTRplus, que contiene datos de los genotipos de una colección de referencia de 186 aislamientos que representan los principales linajes de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta colección incluye cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de los siguientes linajes: W / Beijing, Camerún, Delhi / Asia Central, África-India, Ghana, Haarlem,-Mediterráneo americano (LAM), Turco, S, Uganda I y II, Ural América Oriente y ×.

Al utilizar los datos generados del número de repeticiones de cada locus MIRU-VNTR por análisis de alta resolución de la curva de fusión (HRMA) combinado con el PCR en Tiempo Real para la identificación del linaje filogenético de las cepas presentes en los especímenes clínicos se usó la búsqueda por similitud del programa online MIRU-VNTRplus se observa que el 40.0% no es identificado, 25.71 % de las cepas presentes en los especímenes clínicos es identificado como Haarlem, seguido de la cepa LAM con un 22.86%. 5.71% con identificación múltiple, 2.86% Ghana y 2,86 cepa S. Este análisis fue insuficiente para identificar todas las cepas presentes en los especímenes clínicos.

Con la finalidad de identificar todas las cepas presentes en los especímenes clínicos se utilizó el algoritmo UPGMA para generar un NJ-tree usando el programa online MIRU-VNTRplus. Se observó que la mayoría de las cepas de los especímenes clínicos 62.5% pertenecen al cluster del linaje Haarlem e cual se ha encontrado normalmente en Sudamérica, el segundo grupo con 10 cepas de especímenes clínicos (28.6%) corresponde a la cepa LAM (Latinoamérica - Mediterráneo) y el último grupo con 3 cepas (8.9%) de especímenes clínicos corresponde a la cepa Ghana.

El hecho en poder identificar las cepas circulantes haciendo estudios de epidemiología molecular, en presente estudio mediante el uso los marcadores polimórficos MIRU-VNTR, permite hacer un análisis rápido en situaciones tales como detección temprana y el control rápido de los brotes, establecer casos de transmisión restringido a comunidades, establecer el origen geográfico de las cepas, el control de la contaminación cruzada en los laboratorios de tuberculosis, la detección de genotipos asociados con la resistencia a los medicamentos y diferenciación de los casos de recaída y de los casos de reinfección.

Los resultados obtenidos concuerdan con otros trabajos que indican que los linajes más frecuentes en Sudamérica son LAM y Haarlem (Bazira *et.al.*, 2010 (Cerezo *et.al.*, 2012; Perizzolo *et.al.*, 2011; Kremer *et.al.*, 1999; Filliol *et.al.*, 2003; Ali *et.al.*, 2007; Han *et.al.*, 2007; Silva *et.al.*, 2009). Nuestros resultados en los especímenes clínicos estudiados muestran que el linaje Haarlem es el genotipo circulante de mayor prevalencia en los pacientes del Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Un estudio reciente realizado en el Perú con aislados clínicos de pacientes con TB-XDR pulmonar muestra que la linaje Haarlem es el más común entre las cepas TB-XDR (Cáceres, 2014). Esto indicaría que la vigilancia molecular continua es importante para comprender la dinámica de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, así como la estructura de la población y su relación con la epidemiología de la tuberculosis.

Es preciso señalar que el método MIRU-VNTR por análisis de alta resolución de la curva de fusión (HRMA) combinado con el PCR en Tiempo Real no fue validado por limitaciones en el presupuesto. La validación implica la síntesis de patrones estándar de ADN que tengan de 1 a 5 repeticiones para cada locus MIRU. Sin embargo también es preciso señalar que estas validaciones fueron realizadas por Pang *et.al.*, cuyo metodología sirvió como base para la realización del presente estudio. Una limitación del estudio es que debido al poco volumen de los especímenes clínicos estudiados no se pudo determinar la viabilidad de las cepas mediante medios de siembra.

VII. CONCLUSIONES

1. Se realizó con éxito un estudio de Epidemiología Molecular usando un novedoso método basado en ensayo de punto de fusión de alta resolución combinado con PCR en Tiempo Real, lográndose identificar las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* en los especímenes clínicos del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.
2. Se genotipificaron mediante MIRU-VNTR las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de los especímenes obtenidos en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza
3. Se estandarizó en el laboratorio una técnica rápida de tipificación molecular mediante análisis de HRM de las secuencias MIRU-VNTR.
4. Se identificaron en los especímenes clínicos estudiados las cepas Haarlem, LAM y Ghana.
5. 62.5% de las cepas estudiada formaron un grupo relacionado con la cepa Haarlem, 28.6% formaron un grupo relacionado con la cepa LAM y el 8.9% formaron un grupo relacionado con la cepa Ghana.
6. El locus MIRU más polimórfico fue el locus 960 con 7 alelos seguido del locus 802 con 6 alelos.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Debido a la rapidez y la factibilidad de aplicar el método de HRM para especímenes clínicos se recomienda su uso en los sistemas de vigilancia para la genotipificación rápida y asignación de linaje de las cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Usar la metodología de HRM para la detección de brotes e infecciones comunitarias de *Mycobacterium tuberculosis* y seguimiento de los pacientes con infecciones crónicas y reactivaciones endógenas de Tuberculosis.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón J. (2009). Epidemiología: concepto, usos y perspectivas. Rev. peru. epidemiol. 13 (1): 1-3.

Alcaide F. (2009). ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis? Enferm Infecc Microbiol Clin. 27(9):493-495.

Abadía E; Sequera M; Ortega D; Méndez M V; Escalona A; Da Mata O; Izarra E; Aga R S.; Fair E; Abernethy N F.; DeRiemer K; Paz E A; Kawamura L M; Small P M; Kato-Maeda M. (2006). Microevolution of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* in a strain prevalent in San Francisco. J. Clin. Microbiol. 44 (4):1558–1560.

Ali A; Hasan Z; Tanveer M; Siddiqui A R; Ghebremichael S; Kallenius G; Hasan R. (2007). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* central asian strain I using mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. BMC Microbiol. 7:76.

Alonso M.; Navarro Y.; Barletta F.; Martínez Lirola M.; Gotuzzo E.; Bouza E.; García de Viedma D. (2011). A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution melting analysis. Clin Microbiol Infect. 17(3):349-357.

Allix C; Supply P; Fauville-Dufaux M. (2004). Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. Clin. Infect. Dis. 39:783–789.

Asencios L.; Galarza M.; Quispe N.; Vásquez L.; Leo E.; Valencia E.; Ramírez J.; Acurio M.; Salazar R.; Mendoza-Ticona A, Cáceres O. (2012). Prueba molecular Genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. Rev. Peru .med .exp .salud pública. 29:92-98.

Asencios L; Quispe N; Mendoza-Ticona A; Leo E; Vásquez L; Jave O; Bonilla C. (2009). Vigilancia Nacional de la Resistencia a Medicamentos Antituberculosos, Perú 2005–2006. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 26(3):278–287.

Barletta F; Otero L; Collantes J; Asto B; de Jong B; Seas C; Rigouts L. (2013). Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-eastern part of Lima, Perú. BMC Infectious Diseases. 13:397.

Bates J H.; Stead W W. (1993). The Story of tuberculosis as a global epidemic. Med Clin North Am. 77:1205-1217.

Bauer J; Andersen A B; Kremer K; Mörner H. (1999). Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. J Clin Microbiol. 37(8):2602-2606.

Bazira J; Matte M; Asiimwe B B; Joloba L M. (2010). Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Mbarara, South Western Uganda. Afr Health Sci. 10(4):306–311.

Behr M A.; Mostowy S. (2007). Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. Curr Mol Med. 7:309-17.

Bishop P J; Newmann G. (1970). The history of Ziehl Neelsen Stain. Tubercle (London). 51: 196.

Blackwood K S; Wolfe J N; Kabani A M. (2004). Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? J. Clin. Microbiol. 42:5001–5006.

Bloom B R.; Murray C J L. (1992). Tuberculosis - Commentary on a Reemergent Killer. Science. 257:1055-1064.

Brosch R.; Gordon S V.; Boyd A E. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 99 (6): 3684-3689.

Butler J M; Forensic (2005). DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers; Elsevier Academic Press: London, UK.

Cáceres O.; Rastogi N.; Bartra C.; Couvin D.; Galarza M.; Asencios L.; Mendoza-Ticona A (2014). Characterization of the genetic diversity of extensively-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients in Peru. PLoS One. 9(12):e112789

Cafrune P I; Possuelo L G; Ribeiro A W; Ribeiro M O; Unis G; Jarczewski C A; Rossetti M L; Zaha A. (2009). Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. Can. J. Microbiol. 55(7): 895–900.

Canci A.; Minozzi S.; Borgognini Tarli SM (1996). New evidence of tuberculous spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). Int J Osteoarchaeol. 6:497–501.

Candia N; Lopez B; Zozio T; Carrivale M; Diaz C; Russomando G; de Romero N J; Jara J C; Barrera L; Rastogi N; Ritacco V. (2007). First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. BMC Microbiol. 8(7):75.

Cardullo R A; Agrawal S; Flores C; Zamecnik P C; Wolf D E. (1998). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794.

Cerezo I; Jiménez Y; Hernandez J; Zozio T; Murcia M I; Rastogi N. (2012). A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. Infect Genet Evol. 12(4):657–663.

Chargaff E. (1951). Structure and function of nucleic acids as cell constituents. Fed. Proc. 10:654-659.

Cohn M L; Oda U; Kovitz C; Middlebrook G. (1954) Studies on isoniazid and

tubercle bacilli: the isolation of isoniazid-resistant mutants in vitro. Am Rev Tuberc. 70: 465-475.

Cohn M L; Kovitz C; Oda U; Middlebrook O. (1954) Studies on isoniazid and tubercle bacilli: the growth requirements, catalase activities, and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. Am Rev Tuberc. 70: 641-664.

Cohn L. (1998). The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. Int J Tuberc Lung Dis. 2:16-26.

Cousins D V; Dale J W; Dellagostin O A; Drobniewski F; Engelmann G; Cowan LS; Diem L; Brake M C; Crawford J T. (2004). Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. J. Clin. Microbiol. 42(1):474–477.

Crockett A O; Wittwer C T. (2001). Fluorescein-labeled oligonucleotides for real time- PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. Anal. Biochem. 280:89-97.

Culqui D R.; Trujillo O V.; Cueva N.; Aylas R.; Salaverry O.; Bonilla C. (2010). Tuberculosis en la población indígena del Perú. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 27:8-15.

Dang D A; Barlow R; Banerjee D; Bifani P J; Brudey K; Cataldi A; Cooksey R C; Driscoll J R. (2009). Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Methods Mol. Biol. 551:117–128.

De Cock K M; Chaisson R E. (1999). Will DOTS do it? A reappraisal of tuberculosis control in countries with high rates of HIV infection. Int J Tuberc Lung Dis. 3: 457-465.

Demay C.; Liens B.; Burguière T.; Hill V.; Couvin D.; Miller J.; Mokrousov I.; Sola C.; Zozio T.; Rastogi N. (2012) SITVITWEB – A publicly available international multimarker data-base for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*.12: 755–766.

Edlin B R; Tokars J I; Grieco M H. (1992). An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 326: 1514-21.

Enarson D A.; Chretien J. (1999). Epidemiology of respiratory infectious diseases. *Curr Opin Pulm Med*. 5:128-35.

Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. (2006) *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 55(11): 301-305.

Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. (2006) *Wkly Epidemiol Rec* 81(45): 430-432.

Farnia P.; Masjedi M R.; Mirsaeidi M.; Mohammadi F.; Jallaleddin-Ghanavi.; Vincent V.; Bahadori M.; Velayati A A. (2006). Prevalence of Haarlem I and Beijing types of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. *J Infect*. 53(5):331-336.

Fenton M J.; Vermeulen M W. (1996). Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infect Immun*. 64(3):683-690.

Ferdinand S; Valetudie G; Sola C; Rastogi N. (2004). Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using *ycobacterial* interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. *Res. Microbiol*.155 (8):647–654.

Filliol I; Driscoll J R; van Soolingen D; Kreiswirth B N; Kremer K; Valétudie G; Dang D A; Barlow R; Banerjee D; Bifani P J; Brudey K; Cataldi A; Cooksey R C; Cousins D V; Dale J W; Dellagostin O A; Drobniewski F; Engelmann G; Ferdinand S; Gascoyne-Binzi D; Gordon M; Gutierrez M C; Haas W H; Heersma H; Kassa-

Kelembho E; Ho M L; Makristathis A; Mammina C; Martin G; Moström P; Mokrousov I; Narbonne V; Narvskaya O; Nastasi A; Ngo S; Eyangoh N; Pape J W; Rasolofo-Razanamparany V; Ridet M; Rossetti M L; Stauffer F; Suffys P N; Takiff H; Texier-Maugein J; Vincent V; de Waard J H; Sola C; Rastogi. (2003). Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 41:1963–1970.

Flores L; Jarlsberg L G; Kim EY; Osmond D; Grinsdale J; Kawamura M, Desmond E; Hopewell P C; Kato-Maeda M. (2010). Comparison of restriction fragment length polymorphism with the polymorphic guanine-cytosine-rich sequence and spoligotyping for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with five or fewer copies of IS6110. *J. Clin. Microbiol.* 48(2):575–578.

Flores-Treviño MC.; Mendoza-Olazarán SMC.; Garza-González, ED (2014). Drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico: A systematic review. *Salud Pública de México / vol. 56, N°1.*

Formicola V.; Milanesi Q.; Scarsini C. (1987). Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arenè Candide cave (Liguria, Italy). *Am J Phys Anthropol.* 72:1–6.

Frothingham R; Meeker-O'Connell W A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA re-peats. *Microbiology*, 144 (pt5):1189-96.

Gagneux S.; Burgos M V.; DeRiemer K.; Enciso A.; Muñoz S.; Hopewell P C.; Small P M.; Pym A S. (2006). Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2(6):E61.

Gagneux S; DeRiemer K; Van T; Kato-Maeda M; de Jong B C; Narayanan S; Nicol M; Niemann S; Kremer K; Gutierrez M C; Hilty M; Hopewell P C; Small P M. (2006). Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:2869–2873.

Gagneux S; Small P M. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* 7(5):328–337.

García-García M de L, (2003). Epidemiología molecular en México. *Gac, Méd, Méx.* 139(5): 472-476.

Gibson U E; Heid C A; Williams P M (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.

Glynn J R.; Whiteley J.; Bifani P J.; Kremer K.; van Soolingen D. (2002). Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *Emerging Infectious Diseases* 8(8): 843-849.

González-Candelas F; Bracho M A; Comas I; d'Auria G; Džunková M; García R; Gosalbes M J; Isaac S; Latorre A; López-Labrador F X; Patiño-Galindo J A; Palero F; Pérez-Brocal V; Pérez-Cobas A E; Sánchez-Busó L; Silva F J; Vázquez-Castellanos J F; Moya A. (2014). Estudios de Epidemiología Molecular en población inmigrante en España. *Rev Esp Salud Pública* 88(6): 819-828.

Gori A; Bandera A; Marchetti G; Degli Esposti A; Catozzi L; Nardi G P; Gazzola L; Ferrario G; van Embden J D A; van Soolingen D; Moroni M; Franzetti F. (2005). Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis.* 11(8):1242–1248.

Gutierrez MC.; Brisse S.; Brosch R.; Fabre M.; Omaïs B.; Marmiesse M.; Supply P.; Vincent V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1(1), e5.

Han H; Wang F; Xiao Y; Ren Y; Chao; Guo A; Ye L. (2007). Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. *J Med Microbiol.* 56:1219–1223.

Hawkey P; Smith E; Evans J; Monk P; Bryan G; Mohamed H; Bardhan M; Pugh N. (2003). Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of *Mycobacterium*

tuberculosis Compared to IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Investigation of Apparently Clustered Cases of Tuberculosis. J Clin Microbiol.; 41:3514-3520.

Heid CA; Stevens J; Livak K J; Williams P M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.

Heym B,; Honore' N,; Truffot-Pemot C. (1994). Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. Lancet. 344: 293-298.

Heldal E.; Docker H.; Caugant D. A.; Tverdal A. (2000). Pulmonary tuberculosis in Norwegian patients. The role of reactivation, re-infection and primary infection assessed by previous mass screening data and restriction fragment length polymorphism analysis. Int.J.Tuberc.Lung Dis. 4:300-307.

Higuchi R; Fockler C; Dollinger G; Watson R. (1993). Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 11:1026–1030.

Hinshaw H C.; Feldman W H. (1945) Streptomycin in Treatment of Clinical Tuberculosis. Proc. Staff Meet, Mayo Clinic. 20:313-318.

Holland P M; Abramson R D; Watson R; Gelfand D H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of TherNA polymerase. Proc. Nalt. Aca. Sci. USA 88:7276-7280.

Iwamoto T; Grandjean L; Arikawa K; Nakanishi N; Caviedes L; Coronel J; Sheen P; Wada T; Taype C; Shaw M A; Moore D; Gilman R. (2012). Genetic Diversity and Transmission Characteristics of Beijing Family Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS ONE 7(11): e49651, November 21, DOI: 10.1371/journal.pone.0049651.

Jagielski T.; van Ingen J.; Rastogi N.; Dziadek J.; Pawe B K.; Mazur K. (2014).

Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 645802.

Jain A.; Mondal R. (2008). Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53(2):145–150.

Kamerbeek J.; Schouls L.; Kolk A.; van Agterveld M.; van Soolingen D.; Kuijper S.; Bunschoten A.; Molhuizen H.; Shaw R.; Goyal M.; van Embden J D A. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 35: 907–914.

Kamerbeek J; Kock A; van Agterveld M; van Soolingen D; Kuijper S; Burshoten A. (1997). Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and tuberculosis control. J Clin Microbiol. 35:907-14.

Koksalan O K. (2006). Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Locus 26 for Rapid Identification of Beijing Genotype *Mycobacterium tuberculosis* Strains. J Clin Microbiol. 44(4):1612–1613.

Kontsevaya I S.; Nikolayevsky V V.; Balabanova Y M. (2011). Molecular epidemiology of tuberculosis: objectives, methods, and prospects. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 26: 1–9.

Kovalev S Y; Kamaev E Y; Kravchenko M A; Kurepina N E; Skorniakov S N. (2005). Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU- VNTR genotyping. Int J Tuberc Lung Dis. 9:746-752.

emer K; Arnold C; Cataldi A; Gutierrez M C; Haas W H; Panaiotov S; Skuce R A; Supply P; van der Zanden A G M; van Soolingen D. (2005). Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol. 43: 5628-5638.

Kremer K; Arnold C; Cataldi A; Gutiérrez M C; Haas W H; Panalotov S; Skuce R A;

Supply P; van der Zanden A G; van Soolingen D. (2005). Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol. 43:5628-5638.

Kremer K; Van Soolingen D. ; Frothingham R; Haas W H; Hermans P W; Martín C; Palittapongarnpim P; Plikaytis B B; Riley L W; Yakrus M A; Musser J M; van Embden J D. (1999). (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. Journal of Clinical Microbiology. 37(8):2607-2018.

Kwara A, Schiro R; Cowan L; Hyslop N; Wiser M; Harrison S; Kissinger P; Diem L; Crawford J. (2003). Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 41:2683- 2685.

Laín E. P. (1963). Historia de la medicina moderna y contemporánea. 2ª ed., Barcelona, Científico-médica.

Lambregts-van W. (1998). Drug-resistant tuberculosis in the Netherlands; trifle or threat? Thesis University of Amsterdam, Amsterdam.

Lay M J; Wittwer C T. (1997). Real –time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid –cycle PCR. Clin. Chem. 43:2262-2267.

Le Fleche P; Fabre M; Denoeud F; Koeck J L; Vergnaud G. (2002). High resolution, online identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. BMC Microbiol. 2:37.

Leibbrand W.; Leibbrand A M. (1973). Clínica y patología de la naturphilosophie en Alemania. En: laín P. (dir.), Historia Universal de la Medicina, Barcelona, Salvat, vol. 5, pp. 270-278.

Lindstedt B A; Vardund T; Kapperud G. (2004). Multiple-locus variable–number

tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*. 58:213–222.

Martin A.; Herranz M.; Serrano M J.; Bouza E.; Garcia de Viedma D. (2007). Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiol*. 7:73.

Mathema B.; Kurepina N E.; Bifani P J.; Kreiswirth B N. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (4): 658–685.

Mathema B.; Lewis J J.; Connors J.; Chihota V N.; Shashkina E.; van der Meulen M.; Graviss E A.; Ha N P.; Kreiswirth B N.; Grant A D.; Fielding K L.; Dorman S E.; Churchyard G J. 2015 Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* among South African gold miners. *Ann Am Thorac Soc*. 12(1):12-20.

Mazars E.; Lesjean S.; Banuls A L.; Gilbert M.; Vincent V.; Gicquel B.; Tibayrenc M; Locht C.; Supply P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 98(4):1901–1906.

Metcalfe J.; Kim E Y.; Lin S Y.; Cattamanchi A.; Oh P.; Flood J.; Hopewell P C.; Kato-Maeda M. (2010). Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters. *Emerg Infect Dis*. 16(9):1403-1409.

Meza P.; M. Balcells E M.; Miranda C.; Cifuentes M.; Wozniak A.; García P. (2014). Presencia del genotipo Beijing entre cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en dos centros de salud de la Región Metropolitana-Chile. *Rev Chilena Infectol* 31 (1): 21-27.

MIRU-VNTRplus web application! www.miru-vntrplus.org

Mitchinson D.A. (1998). How drug resistance emerges as a result of floor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *int J Tu rc Lung Dis.* 2: 10-15.

Molina-Moya B.; Lacom A.; Prat C.; Pimkina E.; Diaz J.; García-Sierra N.; Haba L., Maldonado J.; Samper S.; Ruiz-Manzano J.; Ausina V.; Dominguez J. (2015). Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. *J Infect.* 2015. 71(2):220-30.

MINSA: Análisis de la Situación Epidemiológica de la tuberculosis en el Perú, 2015. Ministerio de Salud de Salud, Direccion General de Epidemiologia, 2016. Edición electrónica, Febrero 2016.

MINSA: Control de infecciones de tuberculosis en establecimientos de salud. Módulo de capacitación. Ministerio de Salud, Perú; 2006. Disponible en sntcsntc.medicine.ufl.edu/.../2.%20Módulo%20de%20Capacitacion%20-%2010).

Moström P; Mokrousov I, Narbonne V; Narvskaya O; Nastasi A; Ngo S; Eyangoh N; Pape J W; Rasolofo-Razanamparany V; Ridel M; Rossetti M L; Stauffer F; Suffys P N; Takiff H; Texier-Maugein J; Vincent V; de Waard J H; Sola C; Rastogi. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. (2003). *J Clin Microbiol*, 41:1963–1970.

Narvskaya O; Otten T; Limeschenko E. (2002). Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St.Peterburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21: 596-602.

Nicklas J A; Buel E. (2003). Development of an Alu- based, Real-Time PCR Method for Quantitation of Human DNA in Forensic Samples. *J. Forensic Sci.* 48(5): 936-944.

Niemann S; Richter E; Rusch-Gerdes S. (1999). Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 37(2):409–412.

Nuorala E.; Götherström A.; Ahlström T.; Donoghue H D.; Spigelman M.; Lidén K. (2004). MTB complex DNA in a Scandinavian Neolithic passage grave. In Molecular Palaeopathology. Ancient DNA analyses of the bacterial diseases tuberculosis and leprosy. Paper I. Archaeological Research Laboratory: Stockholm.

Orduz M L; Ribón W. (2015). Molecular Epidemiology of Tuberculosis, Tuberculosis - Expanding Knowledge, Dr. Wellman Ribón (Ed.), ISBN: 978-953-51-2139-8, InTech, DOI: 10.5772/59751. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tuberculosis-expanding-knowledge/molecular-epidemiology-of-tuberculosis>.

Organización Panamericana de la Salud PAHO (2006), Plan regional de Tuberculosis 2006-2015 Washington, D.C: OPS 2006 ISBN 92 75 32673 8.

Organización Panamericana de la Salud. (2013). La tuberculosis en la Región de las Américas: Informe Regional 2012. Epidemiología, control y financiamiento. Washington, DC: OPS.

Organización Panamericana de la Salud. La tuberculosis en la Región de las Américas: Informe Regional. (2012). Epidemiología, control y financiamiento. Washington, DC: OPS, 2013.

Ortner D J.; Putschar W G. (1981) Identification of pathological conditions on human remains. Washington DC: Smithsonian Institution Press.

Ospina S. (2001).Tuberculosis una perspectiva histórico epidemiológica. Infecyio. 5:241-250.

Palomino J.; Leao S.; Ritacco V. (2007).Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. First edition. Brasil.

Pang Y; Zhou Y; Wang S; Lu J; Lu B, He G; Wang L, Zhao Y. (2011). A novel method based on high resolution melting (HRM) analysis for MIRU–VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Methods. 86:291–297.

Perizzolo P F; Dalla Costa E R; Ribeiro A W; Spies F S; Ribeiro M O; Dias C F; Unis G; Almeida da Silva P; Gomes H M; Suffys P N; Rossetti M L. (2011). Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. Tuberculosis. 92(1):56–59.

C. (2003). Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med. 349:1149-1156.

Rasolofo-Razanamparany V; Ramarokoto H; Aurégan G; Gicquel B; Chanteau S. (2001). A combination of two genetic markers is sufficient for RFLP typing of *Mycobacterium tuberculosis* in areas with a high incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol. 39:1530-1535.

Ricardi G.; Pasca M R.; Buroni. S. (2009). *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance and future perspectives. Future Microbiol. 4(5):597-614.

Ririe K M; Rasmussen R P; Wittwer C T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 245(2):154-60.

Ritacco V; Di Lonardo M; Reniero A. (1997). Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. J infect Dis. 176: 637-42.

Rodríguez E L.; Rodríguez C D.; Díaz M L.; González L C. (2000). Tuberculosis en poblaciones prehispánicas de “El Morro de Tulcán” y “El Tambo- Alto del Rey” en el departamento del Cauca, Colombia. Infectio. II encuentro nacional de investigaciones en enfermedades infecciosas. Resumen A-1. 4:17.

Rojas Y; Jaspe R; Motiwala A S; Alland D; de Waard J; Takiff H E. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. BMC Infect Dis. 6(9):122.

Salo W L.; Aufderheide A C.; Buikstra J.; Holcomb T A.; (1994) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre- Columbian Peruvian mummy. Proc Natl Acad Sci USA. 91:2091-2094.

Salyers A. (2002). Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. Second Edition. American Society for Microbiology, USA: 112-116.

Savine E.; Warren R M.; van der Spuy G D.; Beyers N.; van Helden P D.; Locht C.; Supply P. (2002). Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiolog, 40: 4561-4566.

Sharma P; Chauhan D S; Upadhyay P; Faujdar J; Lavania M; Sachan S; Katoch K;, Katoch V M. (2008). Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a rural area of Kanpur by spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) typing. Infect Genet Evol. 8:621-626.

Shinnick T M.; King C H.; Saini D K. (1995). Molecular biology, virulence and pathogenicity of mycobacteria. Am J Med Sci 309: 92-98.

Silva ABSS; Von Groll A; Félix C; Conceição F R; Spies F S; Scaini C J; Rossetti M L; Borsuk S; Dellagostin O A; Almeida Da Silva P E. (2009). Clonal diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in a seaport city in Brazil. Tuberculosis. 89:433–437.

Situación de la Epidemia de SIDA, diciembre 2004 Versión original inglesa, UNAIDS/04.45E, diciembre de 2004: AIDS epidemic update: December 2004, Traducción - ONUSIDA.

Small P M. (1999) Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS. Int J Tuberc

Lung Dis. 3:949-955.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 16(3): 463–496.

Soini H; Pan X; Teeter L; Musser J M; Graviss E A. (2001). Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. J. Clin. Microbiol. 39(1):217–221.

Souza S M. (2003) Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98 :(Sup 1).151-159.

Sun A; Lee A; Ta Ng S; Ravindran S; Kremer K; Bellamy R; Wong S; Van Soolingen D; Supply P; Paton N. (2004). Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. J Clin Microbiol. 42:5058-5064.

Sun Y J; Bellamy R; Lee A S; Ng S T; Ravindran S; Wong S Y; Loch C; Supply P; Paton N I. (2004). Use of mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. J. Clin. Microbiol. 42:1986–1993.

Supply P.; Allix C.; Lesjean S.; Cardoso-Oelemann M.; Rusch-Gerdes S.; Willery E.; Savine E.; Haas P.; van Deutekom H.; Roring S.; Bifani P.; Kurepina N.; Kreiswirth B.; Sola C.; Rastogi N.; Vatin V.; Gutierrez M C.; Fauville M.; Niemann S.; Skuce R.; Kremer K.; Loch C.; van Sooligen D. (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 44:4498-4510.

Supply P.; Lesjean E.; Savine K.; Kremer K.; Van Soolingen D.; Loch C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a Mycobacterial two component system operon. Mol. Microbiol. 26: 991-1003.

Supply P.; Lesjean S.; Savine E.; Kremer K.; van Soolingen K D.; Loch C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units.

Journal of Clinical Microbiology. 39: 3563-3571.

Supply P; Allix C; Lesjean S; Cardoso-Oelemann M; Rüsch-Gerdes S; Willery E; Savine; de Haas P; van Deutekom H; Roring S; Bifani P; Kurepina N; Kreiswirth B; Sola C; Rastogi N; Vatin V; Gutierrez M C; Fauville M; Niemann S; Skuce R; Kremer K; Locht C; van Soolingen D. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 44:4498-4510.

Takashima T; Iwamoto T. (2006). New era in molecular epidemiology of tuberculosis in Japan. Kekkaku. 81(11):693-707.

Torrico R. (2004). Breve recuerdo historico de la Tuberculosis. Archivos de la Historia de la Medicina.10:55-63.

Van Embden J D; Cave M D; Crawford J T. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin Microbiol. 31:406-409.

Van Rie A.; R. Warren.; Richardson M T.; Victor C.; Gie R P.; Enarson D A.; Beyers N.; van Helden P D. (1999). Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. New England Journal of Medicine. 341:1174-1179.

Van Soolingen D. (2001).Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Inter Med. 249:1-26.

Vasconcellos S E.; Acosta C C.; Gomes L L.; Conceição E C.; Lima K V.; de Araujo M I.; Leite M de L.; Tannure F.; Caldas P C.; Gomes H M.; Santos A R.; Gomgnimbou M K.; Sola C.; Couvin D.; Rastogi N.; Boechat N.; Suffys P N. (2014). PLoS One. 9(10):e107747.

Walker N. (2002). A technique whose time has come. Science 296:557-559.

Weniger T; Krawczyk J; Supply P; Niemann S; Harmsen D. (2010). MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Res. 38 (Web Server issue) W326–W331.

WHO Tb burden Estimates. Disponible en Internet en: <http://www.who.int/tb/country/data/download/en/>

WHO/HQ/TB (2015) Global Tuberculosis Report. World Health Organization. ISBN: ISBN 978 92 4 156505 9.

Wilhem J; Hahn M; Pingoud A. (2000) Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. Clin. Chem. 46(11):1738-1743.

Wittwer C T; Herrmann M G; Moss A A; Rasmussen R P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22:130-135.

Wong P; Puray M; Gonzales A; Sevilla C R. (2011). Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. Rev. peru. epidemiol. 15(1): 6-16.

World Health Organization. (2014). Global Tuberculosis Report. Geneva, Switzerland.

Yang Z H; Bates J H; Eisenach K D; Cave M D. (2001). Secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with matching IS6110 fingerprints from different geographic regions of the United States. J. Clin. Microbiol. 39(5):1691–1695.

okooyama E; Kishida K; Uchimura M; Ichinohe S. (2006). Comparison between agarose gel electrophoresis and capillary electrophoresis for variable numbers of tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. Methods 65: 425–431.

Zhang Y.; Heyrn B.; Allen B.; Young D.; Cole S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazi resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 358: 591-593.

Zignol M.; Hosseini M S., Wright A.; Weezenbak C L.; Nunn P.; Watt C J. (2006). Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J. Infect. Dis. 194(4):479–485.

Zink A.; Haas C J.; Reischl U.; Szeimies U.; Nerlich A G. (2001). Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. J Med Microbiol. 50:355-366.